

T 579.83  
ESC  
dia

BIBLIOTECA UCM



5306061896

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE C.C. BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA  
INFECCION POR  
Borrelia burgdorferi



RAQUEL ESCUDERO NIETO  
Madrid, 1993

R. 22.097

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE C.C. BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA  
INFECCION POR  
Borrelia burgdorferi

Memoria presentada por Dña. RAQUEL ESCUDERO NIETO  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Antonio Guerrero Espejo



Carretera de Colmenar km 9,100  
28034 - MADRID

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO  
INSTITUTO NACIONAL DE LA SALUD

HOSPITAL "RAMON Y CAJAL"

Dr. ANTONIO GUERRERO ESPEJO, profesor asociado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares, por la presente declara que:

El trabajo titulado "DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA INFECCIÓN POR Borrelia burgorferi", realizado por la licenciada en C.C. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid Dña. Raquel Escudero Nieto, se ha llevado a cabo bajo mi dirección y reúne las condiciones exigibles para ser presentada como Tesis para aspirar al título de Doctor en C.C. Biológicas.

Lo hago constar en Madrid, a 25 de Octubre de mil novecientos noventa y tres.-

Antonio Guerrero Espejo  
Doctor en Medicina

A mis padres y hermanos

A Joaquín

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento en primer lugar al Hospital Ramón y Cajal, donde he pasado cuatro años de mi vida, por haberme brindado los medios técnicos y humanos necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Antonio Guerrero Espejo, Jefe de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal, por la confianza, generosidad y apoyo constante en la dirección y realización de esta tesis y, sobre todo, por el ejemplo cotidiano de su trabajo.

A Dña. Carmen Quereda, Adjunto de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, sin cuyo estímulo y asesoramiento no hubiera sido capaz de finalizar este trabajo.

A Dña. Paloma Martí-Belda, por la paciencia con que ha soportado los peores momentos de la realización de este trabajo, y por su amistad.

A D. Juan Manuel Aguiar Merino, por su valiosa colaboración.

A D. Victor Abaira, de la Sección de Bioestadística Clínica del Hospital Ramón y Cajal, al que debo el tratamiento estadístico de la Tesis.

A Salomé, María y Marina por los buenos momentos compartidos en la lucha por una causa común.

A mis compañeros, residentes y "allegados" de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, porque desde el primer momento me acogieron entre los suyos.

A las personas que forman parte de la sección de Genética del Hospital Ramón y Cajal, por su apoyo y colaboración.

A la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal, por el interés mostrado en la detección de casos de infección por Borrelia burgdorferi.

A Dña Asunción Ezeizabarrena, por el orden y concierto en el archivado de muestras.

A D. Carlos Molina y a Dña. Ricela Sellek, por su ayuda en los momentos difíciles de la lucha con el ordenador.

Al Dr. Enrique Gómez-Mampaso, por su colaboración.

Al D. Jesús Egido, por el interés demostrado y por su estímulo que me ayudó tanto en la finalización este trabajo.

Al Dr. Jorge Benach, de la Universidad de Stony Broox de Nueva York, por los sabios consejos que me dió en la última etapa de la realización de esta tesis. Fue para mí un honor.

A mi hermana Olga, por su generosa colaboración en la revisión e iconografía de esta tesis.

A Joaquín, que además de soportarme, me ha comprendido y apoyado en todo momento.

A mi familia, es especial a Cuca, porque de alguna manera también ellos han hecho posible que este trabajo llegara a buen fin.

A mis padres, por su estímulo, paciencia y comprensión.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, por la ayuda económica prestada, que permitió el desarrollo del trabajo experimental en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal.

... Y a todos los que, de una forma u otra han colaborado o me han apoyado, haciendo posible la presentación de este proyecto.

## ABREVIATURAS

Bb: Borrelia burgdorferi

BL: Borreliosis de Lyme

EM: Eritema Migratorio

Ir: Ixodes ricinus

ACA: Acrodermatitis Crónica Atrófica

Id: Ixodes dammini

IFI: Inmufluorescencia Indirecta

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

kDa: KiloDaltons

OspA: Outer Surface Protein A

OspB: Outer Surface Protein B

kb: kbases

SDS-PAGE: Electroforesis sobre geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato Sódico

IgM: inmunoglobulinas clase M

IgG: inmunoglobulinas clase G

ELISA: Enzimoimmunoanálisis

PBS: Tampón fosfato salino

NBT: Cloruro de p-nitro azul de tetrazolio

BCIP: 5-bromo-4-clor-3-indolilfosfato

FTA-Abs: Prueba de inmunofluorescencia indirecta con suero preabsorbido

VDRL: Laboratorio para investigaciones sobre enfermedades venéreas

ANA: Anticuerpos Antinucleares

FR: Factor Reumatoide

CDC: The Centers for Disease Control

## INDICE



1.- INTRODUCCION.....	1
1.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS.....	3
1.2.- AGENTE ETIOLOGICO.....	7
1.3.- EPIDEMIOLOGIA.....	11
1.3.1.- AGENTE VECTOR.....	11
1.3.2.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA.....	17
1.4.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.....	17
1.4.1.- DETECCION DIRECTA DEL ANTIGENO.....	17
1.4.2.- CULTIVO DE MUESTRAS CLINICAS PARA EL AISLAMIENTO DE LA ESPIROQUETA.....	18
1.4.3.- SEROLOGIA.....	19
1.4.3.1.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	20
1.4.3.2.- ENZIMOINMUNOANALISIS.....	21
1.4.3.3.- INMUNOBLOT.....	22
1.4.3.4.- SEROLOGIA EN LCR.....	23
1.4.3.5.- VALORACION DE LAS TECNICAS SEROLOGICAS.....	23
1.5.- OBJETIVOS.....	26
2.- MATERIAL Y METODOS.....	27
2.1.- MATERIAL.....	28
2.1.1.- CEPAS UTILIZADAS.....	28
2.1.2.- MEDIO DE CULTIVO.....	28
2.1.3.- MUESTRAS ANALIZADAS.....	29
2.1.3.1.- MUESTRAS CLINICAS PARA CULTIVO.....	29
2.1.3.2.- SUEROS Y LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.....	29
2.1.4.- REACTIVOS.Y MATERIALES.....	29
2.1.4.1.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	29
2.1.4.2.- ENZIMAINMUNOANALISIS.....	30
2.1.4.3.- INMUNOBLOT.....	31
2.1.5.- EQUIPOS.....	33
2.2.- METODO.....	35
2.2.1.- CULTIVO DE LAS MUESTRAS CLINICAS.....	35
2.2.2.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	35

2.2.2.1.- OBTENCION DEL ANTIGENO.....	35
2.2.2.2.- TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	36
2.2.3.- ENZIMOINMUNOANALISIS .....	38
2.2.4.- INMUNOBLOT.....	40
2.2.4.1.- OBTENCION DEL ANTIGENO.....	40
2.2.4.2.- CARACTERIZACION DEL ANTIGENO.....	41
2.2.4.2.1.- VALORACION DE PROTEINAS.....	41
2.2.4.2.2.- ELECTROFORESIS SOBRE GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO SODICO .....	41
2.2.4.3.- TECNICA DE INMUNOBLOT .....	43
2.2.4.3.1.- TRANSFERENCIA.....	43
2.2.4.3.2.- REVELADO.....	43
2.2.4.3.3.- CUANTIFICACION DE LAS BANDAS.....	45
2.2.5.- VALORACION DIAGNOSTICA DE LOS ENFERMOS.....	45
2.2.6.- VALORACION DE LAS TECNICAS SEROLOGICAS.....	47
2.2.6.1.- INDICE KAPPA.....	47
2.2.6.2.- REGRESION LOGISTICA.....	48
2.2.6.3.- RECOGIDA DE DATOS DE LOS PACIENTES.....	50
3.- RESULTADOS.....	53
3.1.- CULTIVO DE MUESTRAS CLINICAS PARA EL AISLAMIENTO DE LA ESPIROQUETA.....	54
3.2.- CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES.....	54
3.2.1.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS PACIENTES.....	55
3.2.2.- EDAD DE LOS PACIENTES Y DISTRIBUCION POR SEXO.....	56
3.2.3.- PROCEDENCIA DE LOS PACIENTES POR SERVICIOS MEDICOS.....	57
3.2.4.- DATOS EPIDEMIOLOGICOS.....	58
3.2.5.- MANIFESTACIONES CLINICAS.....	59
3.2.5.1.- GRUPO I.....	59
3.2.5.2.- GRUPO II.....	62
3.2.5.3.- GRUPO III.....	63
3.2.5.3.1.- ESTUDIO DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS.....	64

3.3.- SEROLOGIA.....	65
3.3.1.- IFI Y ELISA.....	65
3.3.1.1.- RESULTADOS DE IFI Y ELISA EN LA TOTALIDAD DE LOS SUEROS DE LOS PACIENTES.....	65
3.3.1.2.- RESULTADOS DE IFI Y ELISA EN EL PRIMER SUERO RECIBIDO DE CADA PACIENTE.....	66
3.3.1.3.- CONTROLES NEGATIVOS.....	69
3.3.1.4.- CALCULO DEL INDICE KAPPA.....	70
3.3.1.5.- SEROLOGIA EN LCR.....	70
3.3.2.- INMUNOBLOT.....	71
3.3.2.1.- CEPA B31.....	73
3.3.2.2.- CEPA ESP-1.....	80
4.- DISCUSION.....	106
5.- CONCLUSIONES.....	128
6.- BIBLIOGRAFIA.....	130

## RESUMEN

La infección por Borrelia burgdorferi o borreliosis de Lyme (BL) es una enfermedad transmitida por la picadura de una garrapata, generalmente del género Ixodes, que inocula el agente etiológico, Borrelia burgdorferi (Bb). Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad multisistémica pueden ser dermatológicas, articulares, neurológicas o cardiológicas. El diagnóstico de esta infección es en muchos casos difícil, pues puede presentar síntomas y signos a veces inespecíficos, y el cultivo para el aislamiento de la Bb es muy poco rentable. La aportación por tanto de los datos serológicos es indispensable para el diagnóstico de esta infección. El interés por esta enfermedad se ve incrementado por el hecho de que en nuestro país no se ha aislado aún la cepa española a partir de muestras clínicas de enfermos, aunque sí de garrapatas (cepa Esp-1).

El objetivo de este trabajo ha sido el aislamiento de la Borrelia española de muestras clínicas de pacientes, el desarrollo y valoración de las técnicas serológicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoanálisis (ELISA) e inmunoblot con la cepa B31 y con la cepa española Esp-1, el desarrollo de un modelo matemático predictivo de enfermedad, y el conocimiento de las manifestaciones clínicas más frecuentes de esta enfermedad en España.

Debido a la gran variedad de síntomas y signos inespecíficos que produce esta enfermedad, nos hemos basado en los criterios del CDC parcialmente modificados para la valoración de los enfermos. Los pacientes fueron admitidos a este estudio desde 1987 a 1992.

No hemos conseguido aislar la cepa española de Bb a partir de muestras clínicas de pacientes.

Entre 136 pacientes con serología positiva para Bb encontramos 64 que cumplían los criterios de BL; cuarenta y ocho no los cumplían, presentando otras manifestaciones que no pudieron ser justificadas por otras enfermedad.

Hubo 24 pacientes (18%) considerados positivos falsos por presentar otra etiología que justificó los síntomas.

Las manifestaciones clínicas de BL más frecuentes en nuestro estudio han sido las neurológicas (62,5%), seguidas de las cutáneas (30%), articulares (28%) y cardiológicas (3%).

El análisis de las técnicas serológicas reveló una sensibilidad del IFI del 75% y del ELISA del 62% y una especificidad en el grupo de pacientes con serología positiva falsa del 27% y del 60% respectivamente. En base a la concordancia entre ambas técnicas consideramos que son necesarias tanto IFI como ELISA para detectar casos de BL. El inmunoblot con la cepa B31 ha sido menos sensible que la IFI aunque muy similar al ELISA. Su gran especificidad (85%) hace que sea un buen método para eliminar reacciones cruzadas con otras etiologías. El inmunoblot con la cepa Esp-1 no aporta mejores resultados que con la cepa B31. Hemos desarrollado un modelo matemático para predecir la BL basado en los resultados del inmunoblot. Esta predicción se puede obtener aplicando la siguiente fórmula de regresión logística:

$$\ln (p/q) = -2,07829 + (-10,18426 \times G72) + (7,29118 \times G63) + (18,72080 \times G60) + (4,14442 \times M41) + (8,02014 \times G38) + (11,74381 \times G34) + (12,43657 \times M21) + (-8,59503 \times G21)$$

## I . INTRODUCCION

Las borreliosis son enfermedades infecciosas transmitidas por la picadura de artrópodos vectores, y producidas por bacterias del género Borrelia. Estas infecciones son conocidas desde la antigüedad, y producen las fiebres recurrentes, que al igual que el cólera o la peste han jugado un papel importante en la historia de la humanidad. La introducción de los antibióticos e insecticidas ha permitido controlar en parte estas infecciones. Desde la II Guerra Mundial en adelante, el estudio de las borreliosis, "enfermedades del pasado", perdió mucho interés. Prueba de ello fue el descenso del número de publicaciones. Hasta los años 50, ascendía a 50 o más publicaciones por año pero, a partir de entonces, salvo en determinadas endemias (1), el número de publicaciones era inferior a 10 por año (2).

El desarrollo de los medios de cultivo, los problemas debidos a las variaciones antigénicas de las Borrelias y el descubrimiento de nuevas especies, como la Borrelia burgdorferi (Bb), han hecho que aumente el interés por el conocimiento de estas espiroquetas.

La infección por Bb o borreliosis de Lyme (BL) es una enfermedad transmitida por la picadura de una garrapata, generalmente del género Ixodes, que inocula el agente etiológico, Bb. Esta bacteria, perteneciente a la familia de las espiroquetáceas, produce infección en el hombre y en los animales salvajes y domésticos. Es, por lo tanto, el agente de una zoonosis.

Las manifestaciones clínicas de la infección por Bb en el hombre pueden ser dermatológicas, reumatológicas, neurológicas y cardíacas, pues es una enfermedad multisistémica. Sin embargo, lo más característico tras la picadura de la garrapata es la aparición de una lesión cutánea conocida con el nombre de eritema crónico migratorio (EM). Semanas o meses después algunos pacientes desarrollan anomalías neurológicas o cardiológicas y finalmente la enfermedad se puede manifestar por artritis.

El interés por esta infección se ve incrementado por la dificultad en el diagnóstico de la misma, pues puede presentar síntomas y signos inespecíficos, y el cultivo para el aislamiento de la Bb es muy poco rentable. La aportación de los datos

serológicos es, de esta manera, indispensable para el diagnóstico de esta enfermedad.

En España se describe el primer caso de EM en 1977 (3). Desde entonces, y hasta 1986, este cuadro clínico sólo había sido tomado en consideración en revisiones (4). Es en este año cuando durante el "II Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)" se crea el "Grupo de Estudio de la Enfermedad de Lyme en España", dirigido por el Dr. Guerrero, cuyos objetivos eran llamar la atención sobre la existencia de esta enfermedad en nuestro medio y ofrecer métodos diagnósticos para el estudio de la misma (5). Desde entonces comienzan a comunicarse en la literatura casos de infección por Bb en España (6). En 1992 se consiguió aislar la cepa española de Bb (Esp-1) (7) a partir de garrapatas Ixodes ricinus (Ir). Aún en la actualidad no se ha aislado esta cepa a partir de muestras clínicas de enfermos.

### 1.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS.

En 1909, el sueco Arvid Afzelius en una comunicación presentada en la reunión de la Sociedad Dermatológica de Estocolmo (8), describió una lesión cutánea conocida con el nombre de eritema crónico migrans, producida presumiblemente por una garrapata del género Ixodes. Afzelius no publicó sus observaciones hasta 1921 (9). Fue el primer caso referido de una infección que se denominaría EM.

En 1902, se describió en Europa otra lesión cutánea conocida como Acrodermatitis Crónica Atrófica (ACA) (10), cuyas manifestaciones ya se conocían desde 1883 en Europa y desde 1895 en EEUU, y que no fue relacionada con la picadura de una garrapata hasta 1968. A comienzos de siglo se describió también en Europa el tercer tipo de manifestación cutánea que más tarde se relacionaría con la infección por Bb: el linfocitoma (11).

Las primeras hipótesis sobre el agente causal del EM se inclinaban por una partícula vírica transmitida por la mordedura de una garrapata, o una sustancia tóxica implicada en dicha mordedura. En 1923 Lipschütz especulaba sobre un agente



infeccioso como causa de dicha lesión (12).

En 1948, Lennhoff (13) dijo haber visto "elementos con aspecto de espiroquetas" en numerosas lesiones cutáneas que incluían EM, aunque ésto no pudo ser confirmado posteriormente (14).

Otras hipótesis trataban de justificar la aparición de esa lesión como una reacción alérgica tras la picadura de la garrapata (15,16). Esta hipótesis fue abandonada en 1951, cuando Hollström (17) demostró la eficacia del tratamiento con penicilina para la curación del EM. Este hecho, junto con la aparición en 1955 de la lesión cutánea típica en un voluntario que se inoculó una muestra de una biopsia del EM de un enfermo, sugirieron un agente infeccioso como causa de la enfermedad (18). En la misma época, se conseguía el éxito en el tratamiento de la ACA y linfocitoma con penicilina, así como la transmisión experimental de dicho tipo de lesiones de humanos a humanos (19).

En 1962 científicos franceses presentaron evidencias serológicas que sugerían que el EM era una enfermedad rickettsial (20,21). Utilizando una técnica de aglutinación (22) demostraron que varios pacientes con EM tenían títulos altos de anticuerpos frente a Rickettsia prowazekii, R.mooseri y R.conorii. A pesar de que en 1973 Weber (23) no pudo confirmar tal evidencia, la demostración en 1979 de estructuras similares a rickettsias en macrófagos de dos pacientes con EM por microscopía electrónica (24), inclinaban la hipótesis hacia un agente rickettsial como causa del EM.

Finalmente, en 1981 (25), Weber demostró la no existencia de anticuerpos frente a 14 rickettsias diferentes mediante tres técnicas serológicas distintas en pacientes con EM.

El primer caso de EM descrito en los Estados Unidos data de 1962 (14,26). Algunos investigadores consideraban que el agente causal no era una bacteria, aunque era sensible a los antibióticos (27).

En 1972, en una localidad de Connecticut conocida con el nombre de Lyme, comienza un brote epidémico de artritis oligoarticular entre la población juvenil. En 1975, Steere y colaboradores conocen la existencia de tal epidemia, y comienzan

sus esfuerzos por establecer la etiología de esta enfermedad (28).

La acumulación de casos en áreas boscosas, el carácter estacional de la enfermedad (verano y principios de otoño), y el frecuente comienzo del cuadro con una lesión similar a la descrita en Europa como EM, hicieron sospechar que se trataba de una transmisión vectorial por la picadura de una garrapata. En 1977 Steere y cols. concluyeron que dicho eritema y la artritis podrían estar estrechamente emparentados, con un mismo mecanismo de transmisión (29), hecho que ratificaron en 1978 (30).

En 1978 comenzaron los intentos de aislamiento del agente causal de la "artritis de Lyme" en Connecticut, a partir de garrapatas recogidas en dicha localidad (31,32). En ese año, Steere y cols. recogieron una garrapata de una lesión de un paciente con EM, y se la entregaron a Spielman y cols., de la Facultad de Sanidad Pública de Harvard, quienes la identificaron como Ixodes dammini (Id) (33). No obstante no se consiguió el aislamiento de la espiroqueta de estas garrapatas.

Entre 1971 y 1976 Benach y Burgdorfer intentaban aislar el agente causal de la fiebre de las Montañas Rocosas (Rickettsia rickettsii) de la garrapata del perro (Dermacentor variabilis). Sus resultados infructuosos les hicieron pensar en otra especie de garrapata, Id, que había sido implicado en la transmisión de la "enfermedad de Lyme" (31,32). Aunque no consiguieron aislar la Rickettsia, en 1981 encontraron en la hemolinfa de dos hembras de Id unas estructuras que en un principio confundieron con microfilarias, pero más tarde, al teñir con Giemsa una preparación del intestino medio de las garrapatas, observaron que eran estructuras compatibles con espiroquetas débilmente teñidas. La microscopía de campo oscuro de la fracción de intestino medio restante confirmó la naturaleza espiroquetal de los microorganismos hallados (34).

La colaboración posterior de Burgdorfer, Benach, y Barbour, condujo en 1982 a la caracterización morfológica e inmunológica del agente etiológico de esta espiroquetosis (35,36). En sus investigaciones, estos autores colocaron garrapatas infectadas con espiroquetas sobre la piel de conejos albinos, y éstos

desarrollaron una lesión similar al EM, en la que se visualizaban espiroquetas (35). Además, detectaron anticuerpos frente a esta espiroqueta en pacientes con "enfermedad de Lyme", mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) (37). Finalmente, consiguieron el aislamiento a partir de muestras de pacientes como sangre, piel y líquido cefalorraquídeo (LCR), de espiroquetas indistinguibles de la detectada en Id (35,38,39,40).

En Europa, se sospechaba que el Ixodes ricinus (Ir) era el vector implicado en la aparición del EM. Burgdorfer observó en preparaciones de ninfas de Ir, recogidas en Suiza en 1978, estructuras tintorialmente y morfológicamente similares a las posteriormente detectadas en Id (34). Este hecho fue ratificado en 1982 por el mismo Burgdorfer, quien recogiendo Ir de una zona forestal de Suiza (41), observó espiroquetas que, además de indistinguibles en la morfología, eran antigénicamente similares a las aisladas en Id. Esta similitud se comprobó por IFI, utilizando anticuerpos monoclonales frente a la espiroqueta aislada de Id y por el perfil proteínico obtenido por SDS-PAGE (electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico). Analizando por IFI sueros de pacientes con "enfermedad de Lyme" también se observó esta similitud.

Burgdorfer, convencido de que el EM en Europa y la "artritis de Lyme" en Estados Unidos eran expresiones de la misma enfermedad, dirigió su atención a la costa oeste de Estados Unidos, donde se describió el primer caso de EM, en el que se implicaba la garrapata I.pacíficus. Utilizando los mismos procedimientos que con las otras especies de garrapatas, aislaron espiroquetas similares a las halladas en Ir e Id (34).

En 1922 se describe en Francia un caso de afectación neurológica en una mujer que había sido picada por una garrapata y había desarrollado previamente a la clínica una lesión cutánea que no se identificó como EM. Los autores confundieron la clínica con la parálisis asociada a la picadura de garrapata de etiología probablemente tóxica y que desaparece después de retirar el agente vector (42). En el estudio de Steere y col. (29) se presentaban también síntomas neurológicos en pacientes, similares a los

descritos en la literatura y asociados a EM (43). Un caso descrito por Weber en 1974 (44) en el que se describía un paciente con afectación articular además de neurológica, acabaría por explicar la asociación de las manifestaciones cutáneas, neurológicas y articulares de la "enfermedad de Lyme". Finalmente, en 1980 Steere asociaría a la misma enfermedad las manifestaciones cardíacas (45).

En 1983, Weber y cols. encontraron que pacientes con EM, ACA y linfocitoma poseían títulos altos de anticuerpos frente a la espiroqueta (46). Este hecho fue observado por diferentes grupos europeos en los años sucesivos.

En 1984 se le dio el nombre de Bb al agente etiológico de la "enfermedad de Lyme", actualmente conocida como BL o infección por Bb (47). Se le llamó Bb en honor a su descubridor, Willy Burgdorfer (48). A partir de 1984 se consiguió aislar la Bb de lesiones cutáneas de pacientes con ACA y con linfocitoma, de sangre y biopsias cutáneas de pacientes con EM y de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con manifestaciones neurológicas de borreliosis de Lyme.

En la actualidad la infección por Bb es la enfermedad transmitida por garrapata más frecuente en Estados Unidos (49), aunque está distribuida mundialmente (50).

## 1.2.- AGENTE ETIOLOGICO

El descubrimiento del agente etiológico de la "enfermedad de Lyme" se produjo en 1982. Burgdorfer y cols. observaron las espiroquetas, que más tarde recibirían el nombre de Bb, en preparaciones del intestino medio de garrapatas, mediante tinción con Giemsa y microscopía de campo oscuro (35).

Las Borrelias, junto con las Leptospiras y los Treponemas, constituyen la familia Spirochaetaceae, que pertenecen al orden Spirochaetales (tabla 1.1.). Algunas de estas espiroquetas son capaces de producir patología en el hombre (51) (tabla 1.2.).

Orden Spirochaetales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Familia Spirochaetaceae <ul style="list-style-type: none"> <li>Género <u>Spirochaeta</u></li> <li>Género <u>Cristispira</u></li> <li>Género <u>Treponema</u></li> <li>Género <u>Borrelia</u></li> </ul> </li> <li>- Familia Leptospiraceae <ul style="list-style-type: none"> <li>Género <u>Leptospira</u></li> </ul> </li> </ul>
----------------------	--

Tabla 1.1.- Clasificación de las espiroquetas

MICROORGANISMO	ENFERMEDAD
<u>Treponema</u> <u>T. carateum</u> <u>T. pallidum</u> subespecies <u>pertenue</u> <u>T. pallidum</u> subespecies <u>endemicum</u> <u>T. pallidum</u> subespecies <u>pallidum</u>	Pinta Pian Sífilis endémica Sífilis venérea
<u>Leptospira interrogans</u>	Leptospirosis
<u>Borrelia</u> <u>B. especies</u> <u>B. burgdorferi, B. garinii</u> <u>B. del grupo VS461</u>	Fiebre recurrente Borreliosis de Lyme "

Tabla 1.2.- Enfermedades humanas producidas por espiroquetas y sus agentes etiológicos.

Las espiroquetas son bacterias de forma helicoidal y móviles, con un tamaño de 0,1 a 3  $\mu\text{m}$  de ancho y 5 a 250  $\mu\text{m}$  de longitud (52). Poseen una membrana externa que rodea completamente al cilindro protoplásmico; éste consiste en el citoplasma con el aparato nuclear y los plásmidos, envuelto por el peptidoglicano que forma parte de la membrana citoplásmica y que confiere a la célula cierta rigidez.

Poseen uno o varios flagelos periplásmicos, dependiendo de las especies. Estos se sitúan alrededor del cilindro protoplásmico y están envueltos por la membrana externa. El flagelo determina el movimiento en forma de espiral o muelle de las células alrededor de su eje longitudinal.

Bb mide de 0,18 a 0,25  $\mu\text{m}$  de ancho y de 4 a 30  $\mu\text{m}$  de largo (48). Posee 7 flagelos periplásmicos. La espiral de esta espiroqueta se distingue de la de Treponema y Leptospira en que es laxa e irregular.

El análisis químico de la Bb revela que la membrana externa tiene un contenido en proteínas del 45,9%, lípidos del 50,75% e hidratos de carbono del 3,33% (53). Las proteínas, estudiadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, poseen pesos moleculares entre 17 y 100 kDaltons (kDa). De ellas, las mejor conocidas son dos proteínas de la membrana externa denominadas OspA (Outer Surface Protein A) y OspB (Outer Surface Protein B) (30-32 y 34-36 kDa respectivamente), que actúan como antígenos de superficie (54). El antígeno de 41 kDa (antígeno flagelar), y la proteína de 60 kDa juegan un papel importante en el diagnóstico de la infección por Bb, ya que aparecen en la totalidad de cepas aisladas (55). En la variedad europea existe una proteína de 20 kDa llamada pC que se corresponde con una proteína de superficie (56).

El genoma de Bb está distribuido en un cromosoma lineal (excepcional en bacterias) de 1070 kbases (kb) (57) y varios plásmidos (5 en la mayoría de las cepas) lineales y circulares de aproximadamente 50 kb. Este genoma presenta entre el 31 y el 51% de homologías con las otras borrelias (58). Ciertos autores consideran que en los plásmidos se localizan factores de virulencia, ya que la Bb pierde su poder patógeno en los medios de cultivo después de 10 a 15 pases, habiéndose relacionado este hecho con la pérdida de plásmidos (59). Uno de los plásmidos codifica para la proteína de 60 kDa (60), fuertemente inmunógena y común a una gran variedad de bacterias Gram positivas y negativas (60,61). La cepa americana B31 de Bb contiene un plásmido lineal de 49 kb que codifica para las proteínas OspA y OspB (62). Ciertos autores han sugerido la utilización del análisis del perfil plasmídico como método para tipar las distintas cepas de Bb (62).

Recientemente, Baranton y cols. han separado 3 genopecies mediante el análisis de la secuencia de RNAr 16s (63): Bb en sentido estricto, B.garinii, y el grupo VS461. En 1993, se ha correlacionado estas genopecies con la existencia de 7 serotipos definidos por la reactividad con anticuerpos monoclonales frente a diversos epitopos de la proteína OspA (64).

Las borrelias son bacterias microaerófilas. Se encuentran incluidas dentro de los microorganismos de difícil cultivo. Se ha utilizado un medio líquido complejo elaborado por Kelly en 1971 (65), modificado por otros autores a lo largo del tiempo y llamado en la actualidad medio BSK (66,67). La temperatura de crecimiento es de 32 a 34°C y el tiempo de generación de 8 a 24 horas.

La visualización de las espiroquetas sin teñir se realiza mediante microscopía de campo oscuro (figura 1.1.) o contraste de fases, ya que son invisibles al microscopio óptico ordinario por ser su diámetro transversal menor que el poder de resolución del instrumento.



Figura 1.1.- Imagen de la Bb vista mediante microscopía de campo oscuro.

Las borrelias son bacterias Gram negativas. Sin embargo, el Gram es menos sensible que otras tinciones como el Giemsa (35,36), o las sales de plata (68,69). La tinción con naranja de acridina permite también visualizar las espiroquetas (70).

Algunos autores como Barbour y cols. (56), y Wilske y cols (55), entre otros, han observado diferencias entre las cepas de Bb americanas y las cepas europeas, en lo que se refiere a la morfología, número de flagelos, proteínas de membrana externa, plásmidos y codificación del DNA. Estos autores (56,57) observan gran heterogeneidad antigénica y de peso molecular en las proteínas OspA, OspB y pC en las cepas europeas, aunque no así en las proteínas de 41 y 60 kDa. Las cepas americanas presentan homogeneidad en la OspA, mientras que la OspB parece ser más heterogénea.

### 1.3.- EPIDEMIOLOGIA

#### 1.3.1.- Agente vector.

Los principales vectores de la infección por Bb son los ácaros pertenecientes al suborden Ixodida, superfamilia Ixodoidea y familia Ixodidae, que comprenden 650 especies repartidas en 13 géneros (71), siendo los más importantes desde el punto de vista médico Ixodes, Dermacentor, Amblyomma, Haemaphysalis e Hyalomma (72).

En su morfología externa, son aplanados dorsoventralmente, ovales y de 3 a 23 mm de longitud dependiendo de las especies y de si están alimentados o no. Las hembras son más grandes que los machos.

Se pueden distinguir dos regiones bien definidas en su cuerpo: el gnatosoma o capítulo en la parte anterior y el idiosoma que constituye el resto.



### 1.- GNATOSOMA

También llamado rostro o "falsa cabeza" está situado anteriormente, es visible por encima, y distingue las garrapatas duras (familia Ixodidae) de las garrapatas blandas (familia Argasidae). El capítulo está constituido a su vez por las piezas bucales, mediante las cuales la garrapata corta el tejido del huésped y se fija para alimentarse, y una base denominada base del capítulo que se articula libremente con el idiosoma y en la que se implantan las piezas bucales.

### 2.- IDIOSOMA

La superficie dorsal está recubierta siempre de una placa o escudo, muy quitinizado, llamado escudo dorsal. En los machos éste recubre casi completamente la parte dorsal, y en las hembras, larvas y ninfas ocupa sólo la mitad anterior. El escudo posee unos surcos típicos, de valor taxonómico.

Los ojos se insertan en los bordes del escudo. Son muy imperfectos, y su función es probablemente la de distinguir la luz y a lo sumo el movimiento. La cara ventral posee la abertura genital. Los machos en algunos géneros, poseen placas esclerosadas o escudos en las proximidades del ano, cuya disposición, número y forma determinan la taxonomía.

Las ninfas y adultos poseen 4 pares de patas que terminan en uñas, y las larvas 3 pares.

Generalmente estas garrapatas son oscuras, pero pueden poseer colores en el escudo y patas (especies ornamentadas). No poseen órganos coxales.

El género Ixodes posee un caracter que lo distingue fácilmente del resto de los Ixodidae: el surco anal en forma de herradura bordeando al ano por delante. Es una especie carente de ojos, con un rostro largo y un escudo de una sola tonalidad (figura 1.2. y figura 1.3.).

Los principales vectores de la infección son distintos dependiendo del área geográfica en el que se encuentren (tabla 1.3.).

ESPECIE	LOCALIZACION
<u>I.dammini</u>	Noroeste, zonas media-alta de EEUU
<u>I.pacíficus</u>	Costa oeste de EEUU
<u>I.scapularis</u>	Sureste de EEUU
<u>I.ricinus</u>	Europa y norte Africa
<u>I.persulcatus</u>	Asia
<u>Amblyomma americanum</u>	Este y sur de EEUU

Tabla 1.3.- Principales ácaros vectores de la infección por Bb y su distribución geográfica.



Figura 1.2.- Vista dorsal de I.r hembra (aportación original).



Figura 1.3.- Vista ventral de Ixora hembra (aportación original).

El ciclo vital de estas garrapatas comprende 4 estadios: huevo, larva, ninfa y adulto. Es un ciclo trifásico, es decir, parasitan 3 huéspedes.

Los adultos suelen permanecer alimentándose en el huésped durante 1 a 4 semanas. Luego se desenganchan y buscan refugio bajo las hojas, piedras, detritus, raíces de hierbas y arbustos, o se esconden bajo la superficie del suelo. Las hembras ponen de 1000 a 8000 huevos en un tiempo muy variable después de la alimentación, y después mueren. Las larvas salen y permanecen inactivas hasta que trepan por la vegetación en busca de un huésped. Responden a estímulos como dióxido de carbono, olor, calor, sombra, vibraciones y movimientos, moviendo las patas delanteras y realizando lo que se denomina "questing". Se fijan al huésped, y se alimentan de 3 a 7 días. Después caen a la vegetación y se transforman en ninfas, que igualmente buscarán un huésped del que alimentarse, realizando el "questing". Una vez alimentadas, caen, se transforman en adultos y comienza de nuevo el ciclo.

Algunas especies son más o menos específicas en cuanto al huésped. En general las larvas y ninfas tienen predilección por huéspedes pequeños. El 90% de ellas se alimentan de roedores del género Peromyscus leucopus (73), y el resto de pájaros (que explicaría en parte la amplia distribución de la infección en distintos continentes), (74), reptiles, etc. Los adultos, en general, se alimentan de huéspedes grandes (caballos, vacas, etc.) (75) (tabla 1.4.). El hombre es parasitado por todos los estadios, pero preferentemente por larvas y ninfas. Los huéspedes animales no suelen estar afectados por la enfermedad y pueden servir como reservorios de la espiroqueta. Especialmente actúan como tales los ratones y los pájaros.

A pesar de que algunos autores han descrito la transmisión transovárica de la Bb que posibilitaría la perpetuidad de la espiroqueta en las garrapatas (76), Burgdorfer y cols. observaron que las garrapatas con gran cantidad de espiroquetas no producían por lo general huevos viables, lo que controlaría en cierta medida la transmisión de la infección (77).

GARRAPATAS	HUESPEDES ANIMALES PARA CADA ESTADIO	
	LARVAS Y NINFAS	ADULTOS
<u>I.dammini</u>	Roedores, insectívoros, pájaros	Ciervos perros
<u>I.scapularis</u>	Escinco, pájaros, roedores	Ciervos, osos, perros, cerdos
<u>I.pacíficus</u>	Lagartos, pájaros, roedores	Ciervos, osos, perros
<u>I.dentatus</u> <u>I.ricinus</u>	Conejos, pájaros Roedores, insectívoros pájaros	Conejos Ciervos, perros, liebres, vacas
<u>I.persulcatus</u>	Roedores, insectívoros pájaros	Ciervos, perros, liebres, vacas

Tabla 1.4.- Principales huéspedes de Ixodes.

La Bb se ha encontrado en el intestino de las garrapatas, por lo que algunos autores han postulado que la transmisión de la espiroqueta al huésped debe ser mediante regurgitación del material del intestino (34), o a través de la saliva (78).

Ir tienen un ciclo vital con una duración media de 3 años, con un máximo de actividad en primavera y otoño, y un mínimo en verano e invierno. Necesita fluctuaciones de temperatura con valor máximo de 35°C y mínimo de 10°C, y una humedad relativa del 80%.

En España se ha encontrado Ir en numerosos animales: perro, cabra, ciervo, erizo orejudo, vaca, oveja, ratón campero, lirón careto, rata de agua, murciélago ratero, liebre, turón, marta, gamo, zorra, mirlo y jabalí (79). Se ha comprobado también que es el vector de Bb en España (80). En Europa central se ha relacionado directamente la intensidad de transmisión de la infección por Bb con la presencia de los "ratones de bandas negras", Apodemus agrarius, e inversamente con la presencia de lagartos (81).

Las garrapatas son los principales vectores de la infección por Bb. Sin embargo, también se ha implicado en la transmisión de esta infección los mosquitos y las moscas (82), lo que podría explicar la ausencia, en algún caso, del antecedente de mordedura de garrapata. Otras especies de garrapatas implicadas en la transmisión de la Bb, además de las descritas anteriormante son: I.dentatus, Dermacentor albipictus, D.parumapertus, D.variabilis, Haemaphysalis leporipalustris, Rhipicephalus sanguineus, y Ornithonyssus bacoti, Argas persicus y Ornithodoros coriaceus (35,83,84).

La espiroqueta se ha aislado de la orina de roedores, perros y vacas (85), proponiéndose un posible mecanismo de transmisión directa de la infección por Bb. También se ha descrito la transmisión de la espiroqueta de la madre infectada al feto (86), constatándose tal hecho por la recuperación de la Bb en muestras clínicas del niño.

### 1.3.2.- Distribución geográfica de la infección por Bb.

La infección por Bb está distribuída mundialmente (50), correspondiendo a las zonas de existencia de los vectores responsables de la transmisión de esta infección. Se han descrito casos de infección por Bb en América (EEUU y Canadá), Australia, Europa (Dinamarca, Suecia, Gran Bretaña, Irlanda, Francia, Alemania Occidental, Suiza, Austria, Bélgica, Holanda, Luxemburgo, Hungría, Italia, Rumanía, Rusia, Eslovenia, Checoslovaquia, Portugal, España), Asia (Japón y China), y Africa (regiones de Centro y Sur).

### 1.4.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

#### 1.4.1.- Detección directa de Bb.

Para la visualización directa de la espiroqueta en muestras clínicas, como biopsias cutáneas y de tejido sinovial, LCR y sangre, se han utilizado tinciones como la plata (Warthin-Starry, Dieterle y Steiner) (68,87,88), el Giemsa (35,36), y el naranja de acridina (70). El Gram no se suele utilizar ya que la espiroqueta cambia su forma en el proceso de fijación y tinción. El inconveniente de estas técnicas de coloración es que las espiroquetas se pueden confundir con otras estructuras como restos celulares, y el diagnóstico debe ser confirmado con otras técnicas como el cultivo o la serología.

La microscopía de campo oscuro se ha utilizado para la visualización de la Bb en muestras clínicas como sangre, hígado y riñón de animales infectados, y para los cultivos en los que el número de espiroquetas era grande.

Se han utilizado anticuerpos policlonales contra la espiroqueta para la detección de la misma en tejidos, mediante estudios inmunohistológicos (89), y anticuerpos monoclonales que permiten determinar el tipo específico de espiroqueta de que se trate (90).

La inmunofluorescencia directa se ha utilizado para el estudio de prevalencia de garrapatas infectadas en determinadas zonas geográficas (76,80,91). También se ha utilizado la inmunoperoxidasa (92), que emplea inmunoglobulinas marcadas con peroxidasa.

Otras estrategias para la visualización de la espiroqueta son la utilización de sondas de DNA (60,93,94), la detección del antígeno en orina (95), la utilización del microscopio electrónico (96), y más recientemente la "reacción en cadena de la polimerasa" o PCR, que permite detectar el genoma del microorganismo en muestras clínicas mediante la amplificación del DNA (97,98).

#### 1.4.2.- Cultivo de muestras clínicas para el aislamiento de la espiroqueta.

Aunque se ha aislado la Bb a partir de muestras clínicas, como sangre (35,38,40,67,99,100), LCR (99,101), líquido sinovial (102), biopsias cutáneas (40,99,103,104), e incluso corazón (105), el porcentaje de recuperación es muy bajo (2 a 6% en líquidos orgánicos, y 6 a 45% del borde del EM), lo que hace suponer el escaso número de espiroquetas en los diversos órganos (106). Existen teorías que apoyan el hecho de que la espiroqueta tenga una presencia corta en la sangre, lo que justificaría también este bajo porcentaje de recuperación (107).

La riqueza en componentes del medio empleado con la consiguiente facilidad de contaminación del mismo, el lento crecimiento de este microorganismo (67), la baja sensibilidad en la recuperación de la espiroqueta, y el hecho de que pueda verse afectada por el tratamiento antibiótico recibido por el paciente, hacen que el cultivo de muestras clínicas para el aislamiento de la misma no se haga de forma rutinaria.

Una alternativa para el cultivo de Bb es la inoculación de muestras clínicas en animales de experimentación. Algunos autores han conseguido recuperar la Bb del hígado, riñón y bazo de roedores del desierto (108). Sin embargo, es una técnica que está sólo al alcance de laboratorios especializados.

Una vez aislada la espiroqueta, la diferenciación e identificación de la misma suele realizarse por su patrón proteínico, obtenido por separación por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Wilske y cols. han utilizado anticuerpos monoclonales contra las proteínas OspA, pC (20-22 kDa) y p100 para distinguir la Bb de las borrelias de las fiebres recurrentes (109).

#### 1.4.3.- Serología

Antes del descubrimiento del agente etiológico de la borreliosis de Lyme, Steere y cols. relacionaron la presencia de crioglobulinas IgM con la actividad de la infección, y la presencia de IgG con la remisión de la misma (110). En 1983 se comenzó a utilizar la inmunofluorescencia indirecta en la detección de anticuerpos frente a Bb en pacientes con EM (111). Se demostró la presencia de anticuerpos tipo IgM al comienzo de la infección, y a las 6 semanas la producción de anticuerpos tipo IgG.

En líneas generales, al comienzo de la infección por Bb, el paciente suele desarrollar anticuerpos de tipo IgM (inmunoglobulinas M) (entre la 2ª y 4ª semana del comienzo del EM). Estos alcanzan el máximo en la 6ª u 8ª semana, y luego comienzan a decrecer. Sin embargo, en algunos pacientes, el título de IgM permanece alto durante meses, o incluso puede reaparecer en las fases tardías de la infección. Este fenómeno indica la posible existencia de infección crónica. Los anticuerpos de clase IgG (inmunoglobulinas G) se desarrollan en la 4ª u 8ª semana del comienzo de la infección, alcanzan su máximo al cabo de 4 o 6 meses, y permanecen elevados en pacientes con infección crónica (112).

En la actualidad, son tres las técnicas serológicas empleadas para el estudio de la respuesta de anticuerpos de los pacientes con infección por Bb: la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el enzimoimmunoensayo (ELISA) y el inmunoblot.



## 1.4.3.1.- IFI

Fue la primera técnica serológica empleada. Emplea células completas de *Borrelia* fijadas a portaobjetos. El suero del paciente se enfrenta a la espiroqueta fijada, y se revela con inmunoglobulina antihumana marcada con fluoresceína (figura 1.4). Los valores de sensibilidad y especificidad de este ensayo están sujetos a la subjetividad del lector, pues el título de anticuerpos antiborrelia del paciente se obtiene por el nivel de fluorescencia que se observe en los portaobjetos, pudiendo ser diferente dependiendo de la lectura realizada.

Algunos autores han utilizado materiales absorbentes, como los derivados del *Treponema phagedenis* biotipo Reiter (113,114,115) o de la *B. hermsii* (116), para eliminar posibles reacciones cruzadas de la Bb con otras espiroquetosis, pero los resultados son controvertidos.

El factor reumatoide puede reaccionar con la Bb, siendo la causa de la posible existencia de falsos positivos. Se ha propuesto la eliminación de los mismos mediante el pretratamiento del suero del paciente con una inmunoglobulina anti-IgG (117).

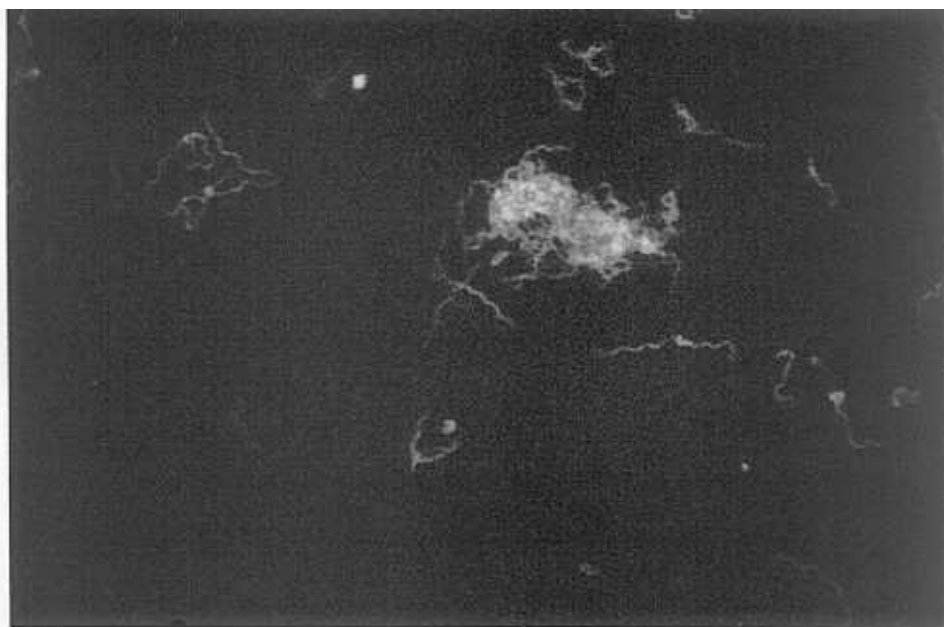


Figura 1.4.- Imagen de la Bb vista por IFI

#### 1.4.3.2.- ELISA

La mayoría de los ELISAs utilizan extractos completos o sonicados de la espiroqueta como antígeno. A diferencia del IFI, en el ELISA el revelado se realiza con inmunoglobulinas antihumanas marcadas con una enzima (figura 1.5.).

Se han realizado modificaciones de esta técnica, en las que como antígeno se utiliza el flagelo de la Bb (61), una fracción enriquecida del mismo (118,119), distintas fracciones de la espiroqueta (120), o bien, se realiza un paso previo de absorción para eliminar posibles reacciones cruzadas (121). También se ha desarrollado un ELISA de captura (122). Berardi y cols. obtienen mejores resultados con él en la detección de anticuerpos de pacientes con infección temprana, que con la utilización del ELISA convencional, aunque el tiempo empleado sea mayor. Recientemente se ha utilizado un ELISA en el que previamente se secuestran los anticuerpos en inmunocomplejos, y con el que se obtienen buenos resultados en pacientes seronegativos (123).

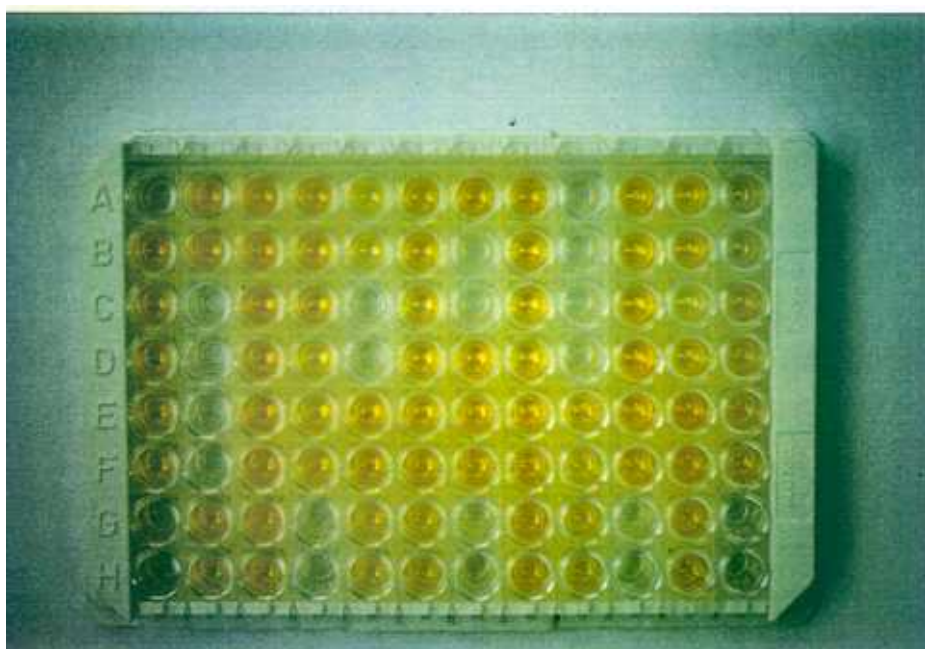


Figura 1.5.- Imagen de una placa de ELISA.

#### 1.4.3.3.- Inmunoblot

Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida se separan los distintos componentes proteínicos de la Bb. Estos se transfieren a membranas de celulosa y, tras el enfrentamiento de los sueros a estas membranas, se conoce el espectro de reactividad de los anticuerpos contra los diferentes antígenos de la *Borrelia*, utilizando una inmunoglobulina antihumana marcada con una enzima.

Dos son las bandas proteínicas de la Bb detectadas en casi la totalidad de las cepas aisladas hasta la actualidad. Estas poseen unos pesos moleculares de 41 y 60 kDa, respectivamente (2,55). La banda de 41 kDa corresponde al antígeno flagelar, y la de 60 kDa es un antígeno común a una gran variedad de bacterias, cuya naturaleza como proteína de stress térmico se cuestiona (60).

La proteína OspA aparece en la región comprendida entre la banda de 30 kDa y la de 32 kDa, la OspB está situada entre 34 y 36 kDa, y la pC entre 21 y 22 kDa, dependiendo de las cepas. Las proteínas OspA y OspB están situadas en la envoltura externa de la Bb y son codificadas por un plásmido lineal.

Mayor variabilidad existe entre las demás bandas proteínicas detectadas en las diferentes cepas de Bb. Se han detectado proteínas de 100, 94, 88, 83, 66, 57, 55, 50, 45, 39, 29 y 25 kDa.

Al comienzo de la infección por Bb, se suelen detectar anticuerpos de tipo IgM contra el antígeno flagelar de 41 kDa (86,47), y contra las proteínas de 60 a 66 kDa (112). A las 6 u 8 semanas de la enfermedad, los anticuerpos de tipo IgM comienzan a decrecer y son sustituidos por los de tipo IgG contra las proteínas de menor peso molecular (21-22 kDa, 31 kDa y 34 kDa) (112). En 1992 Jiang y cols. describieron el mapa péptico del antígeno flagelar (124). El papel del flagelo en la patogénesis de la infección por Bb se desconoce, pero podría estar implicado en la invasión y/o ataque de las células huéspedes. Recientemente, Luft y cols. han declarado que los mejores marcadores para la infección por Bb son las proteínas de 41 y de 93 kDa (125).

#### 1.4.3.4.- Serología en LCR

Además del análisis de los anticuerpos frente a Bb en el suero, se han realizado estudios para detectar su presencia en el LCR. En 1985, investigadores europeos detectaron una respuesta mayor de anticuerpos frente a Bb en el LCR que en el suero de pacientes con manifestaciones neurológicas (126). A partir de entonces se comenzó a estudiar emparejadamente suero y LCR de pacientes con este tipo de manifestaciones, con la finalidad de evidenciar la producción intratecal de IgG dirigida contra la Bb (127).

#### 1.4.3.5.- Valoración de las técnicas serológicas.

Son varios los factores que pueden influir en los valores de sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas empleadas: la cepa de Bb utilizada, la naturaleza de la misma, la valoración del título total de anticuerpos IgG e IgM del paciente o de cada una de las clases específicas individualmente, y las reacciones cruzadas.

La cepa más comunmente empleada es la B31 (ATCC 35210), cepa que fue aislada de la garrapata Id en 1982. Las cepas posteriormente aisladas en Estados Unidos son más o menos similares antigénicamente (55,56,91,128,129,130,131), mientras que la variabilidad existente entre las cepas de Bb europeas podría influir en los resultados de las técnicas serológicas (56,132,133,134).

Se pueden obtener diferentes resultados dependiendo de la naturaleza del antígeno empleado: células completas, lisados, lisados sonicados, fracciones enriquecidas del flagelo, etc.

Otro factor que debe tenerse en cuenta es el título de anticuerpos totales (IgG e IgM), o el título específico de cada una de las clases. En general, mientras que el título de IgM puede ser menos específico, es más sensible al comienzo de la

infección. En las fases avanzadas, la respuesta de IgM desaparece, mientras que la producción de IgG es mayor.

La especificidad de las técnicas serológicas se puede ver afectada por la existencia de reacciones cruzadas del antígeno de la Bb con las proteínas presentes en diversos síndromes y enfermedades como sífilis (114,116), pían y pinta (37,115,116), fiebres recurrentes (116), artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (37,111,112,135), mononucleosis (99,115,126), enfermedad periodontal (136), fiebre de las Montañas Rocosas (135) y, en menor proporción, leptospirosis (37,116).

Se han detectado anticuerpos de tipo IgM en pacientes con manifestaciones tardías de la infección, por lo que su utilización como parámetro para saber si la infección es reciente o no, debe ser interpretado con cautela. Tal hecho puede ser debido a una nueva picadura de garrapata y reinfección, o tratarse de un fenómeno recurrente. Los anticuerpos de tipo IgG pueden permanecer elevados durante meses e incluso años.

El desarrollo de una respuesta inmune en pacientes con infección por Bb no es siempre protectoro. El hecho de que se haya observado la espiroqueta en tejidos de pacientes con altos niveles de anticuerpos indicaría la no erradicación de la infección (137), y la persistencia de los síntomas en pacientes tratados con antibióticos hacen suponer que puede haber otros mecanismos responsables de los síntomas e independientes de la infección crónica (138).

La relativa alta proporción de pacientes con infección por Bb y serología negativa, sobre todo en los casos de pacientes con EM (37,113), puede ser explicada por el retraso en la producción de anticuerpos (112), el tratamiento antibiótico (139), la recogida del suero antes de que los niveles de anticuerpos fueran detectables, y el criterio de positividad empleado. La monitorización de los títulos de anticuerpos no puede ser

utilizada en esos casos como control de mejoría de la infección, pues los antibióticos pueden abortar la respuesta inmunológica.

La presencia de anticuerpos residuales, posiblemente representativos de una infección pasada, pueden dificultar la interpretación de los resultados, siendo necesarios estudios de seroprevalencia frente a Bb en aquellas comunidades con casos de borreliosis de Lyme. En Europa los datos de seroprevalencia van desde valores del 3% al 40% (140). El hecho de que se trate de anticuerpos no específicos, o representativos de una infección latente, es en la actualidad, materia de especulación.

### 1.5.- OBJETIVOS

1.- Cultivo de muestras clínicas (biopsias cutáneas, sangre y LCR) en medio de Kelly modificado para el aislamiento de la cepa española de Bb.

2.- Desarrollo de la técnica de IFI e inmunoblot con la cepa B31 para la detección de anticuerpos frente a Bb.

3.- Conocer la frecuencia de las manifestaciones clínicas de la infección por Bb en España.

4.- Estudio comparativo entre IFI, ELISA e inmunoblot utilizando sueros de pacientes con procesos compatibles con la BL y sueros de donantes de sangre, valorando sensibilidad, especificidad y aplicabilidad de cada una de las técnicas.

5.- Utilizando la cepa española Esp-1, valorar la utilidad del inmunoblot en los casos de pacientes con serología positiva para Bb por otras técnicas.

6.- Analizar la concordancia de las técnicas serológicas.

7.- Establecer un modelo matemático predictivo de infección por Bb basado en los resultados del inmunoblot.

## II. MATERIAL Y METODOS



## 2.1.- MATERIAL

### 2.1.1.- CEPAS EMPLEADAS

Las cepas de Bb empleadas en este trabajo fueron las siguientes:

- Cepa B31: cepa americana aislada de la garrapata Id, procedente de Shelter Island (USA) (ATCC 35210), utilizada en las tres técnicas serológicas.

- Cepa Esp-1: Cepa española aislada de la garrapata Ir, utilizada en el inmunoblot.

### 2.1.2.- MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó para el cultivo el medio de Kelly modificado (BSK II) (66), cuya composición es la siguiente:

- Agua destilada.....900 ml.
- 10 X CMRL 1066 sin glutamina y  $\text{NaHCO}_3$  (Gibco)...100 ml.
- Neopeptona (Difco).....5 g/l.
- Fracción V sérica de albúmina bovina (Sigma).....50 g/l.
- Yeastolate (Difco)..... 2 g/l.
- HEPES (Sigma).....6 g/l.
- Glucosa (Malinckrodt).....5 g/l.
- Citrato sódico (Sigma).....0,7 g/l.
- Piruvato sódico (Sigma).....0,8 g/l.
- N-Acetil glucosamina (Sigma).....0,4 g/l.
- Bicarbonato sódico (Sigma).....2,2 g/l.

Una vez disueltos todos los componentes en agitación, se ajustó el pH a 7,6 con NaOH 1N. El medio se esterilizó por filtración al vacío, utilizando un filtro de acetato de celulosa de Millipore con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ .

El medio se suplementó con 70 g/l de gelatina.

Se utilizaron tubos de cristal estériles en los que se añadió 5 ml del medio. Una vez sembrada cada muestra se añadió al medio suero de conejo esterilizado por filtración (filtros de 0,22  $\mu$ m), para conseguir una solución al 6% de suero de conejo.

### **2.1.3.- MUESTRAS ANALIZADAS**

#### **2.1.3.1.- Muestras clínicas para cultivo**

Las muestras clínicas empleadas fueron: sangre, biopsia cutánea y LCR.

#### **2.1.3.2.- Sueros y LCR**

Los sueros y LCR procedentes de pacientes con sospecha de infección por Bb fueron recogidos en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal de Madrid y procedían del mismo hospital y de otros diecisiete hospitales españoles. El período de recogida de muestras fue el comprendido entre Enero de 1987 y Diciembre de 1992. Los sueros y LCR se distribuían en varias alícuotas, y se mantenían a -70°C hasta su uso.

Los sueros empleados como controles negativos eran de donantes de sangre y fueron obtenidos en el Banco de Sangre del Hospital Ramón y Cajal.

### **2.1.4.- REACTIVOS Y MATERIALES**

#### **2.1.4.1.- IFI**

Antes de la fijación de las espiroquetas a los portaobjetos, éstas se lavaron con tampón fosfato salino (PBS-MgCl<sub>2</sub> -ácida), cuya composición fue la siguiente:

- Agua destilada.....1 l.
- NaCl.....9 g/l.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....0,165 g/l.
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....0,67 g/l.
- $\text{NaN}_3$  al 10% en agua destilada.....2 ml.
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,25 M.....1,75ml.

Para las diluciones de los sueros a analizar se utilizó tampón fosfato salino (PBS), con Tween y ácida de sodio (PBS-Tween-ácida) con la siguiente composición:

- NaCl.....7,65 g/l.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....0,72 g/l.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....0,21 g/l.
- Tween-20.....500  $\mu\text{l/l}$ .
- $\text{NaN}_3$  al 10%.. .....2ml.

Se empleó PBS pH 7,2 proporcionado por BioMerieux en los lavados de los portaobjetos para la eliminación de los restos de anticuerpos no unidos al antígeno.

Los anticuerpos antiinmunoglobulina humana de oveja conjugados a fluoresceína utilizados, fueron proporcionados por la casa Wellcome. En cada ensayo se empleó un control positivo de sífilis FTA-ABS de la casa comercial Biomerieux.

Los portaobjetos con 15 pocillos de 5mm de diámetro cada uno eran de la casa comercial Cultek.

#### 2.1.4.2.- ELISA

Se utilizó un ELISA proporcionado por la casa comercial MarDx, que emplea la cepa B31 de Bb fijada a placas de poliestireno.

### 2.1.4.3.- Inmunoblot

Para la obtención del antígeno para el Inmunoblot se utilizó una membrana de diálisis (SPECTRA/POR1 dialysis membranes), de Spectrum Medical Industries Inc.

Empleamos reactivos comerciales (BCA\* Protein assay reagent de Pierce) para determinar la concentración de proteínas en el extracto antigénico obtenido.

Para la fabricación de los geles empleamos los siguientes reactivos: acrilamida, bisacrilamida, dodecil sulfato sódico, persulfato amónico y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) Todos fueron suministrados por BioRad.

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- Solución patrón al 30% de acrilamida-bisacrilamida:

Acrilamida.....14,6 g.

Bisacrilamida.....0,4 g.

Agua destilada hasta 50 ml.

- Tampón del gel separador: Tris-ClH 1,5M, pH 8,8.

Tris Base.....18,15 g.

Agua destilada hasta 100ml.

Ajustado con ClH a pH 8,8.

- Solución del gel separador:

Solución patrón..... 4 ml (geles al 12%).

Tampón del gel separador....2,5 ml.

SDS al 10%.....100 µl.

Agua destilada .....3,35 ml.

Persulfato amónico al 10%...50 µl.

TEMED..... 5 µl.

- 
- Tampón del gel concentrador: Tris-ClH 0,5 M pH 6,8.
    - Tris Base.....3 g
    - Agua destilada hasta 50 ml.
    - Ajustado con ClH a pH 6,8.
  
  - Solución del gel concentrador:
    - Solución patrón .....1,3 ml.
    - Tampón del gel concentrador...2,5 ml.
    - SDS al 10%.....100 µl.
    - Agua destilada .....6,1 ml.
    - TEMED.....10 µl.
  
  - Tampón de tratamiento de muestra:
    - Tris-ClH 0,5 M pH 6,8.....2,5 ml.
    - SDS 10%.....4 ml.
    - Glicerol .....2 ml.
    - 2-mercaptoetanol .....1 ml.
    - Azul de bromofenol .....1 mg.
    - Agua destilada.....0,5 ml.
  
  - Tampón de llenado de la cubeta para la electroforesis de proteínas (pH 8,6):
    - Tris base.....12 g.
    - Glicina .....57,8g.
    - SDS 10%.....40 ml.
    - Agua destilada hasta 4 l.
  
  - Tampón de transferencia:
    - Tris 25 mM pH 8,3.
    - Glicina 192 mM.
    - Metanol 20%.
  
  - Tampón de bloqueo para el enfrentamiento de los sueros:
    - Tris-HCl 0,01M.
    - ClNa 9%.
    - Leche de vaca descremada en polvo 8,8%.

Los marcadores preteñidos fueron facilitados por la casa BioRad y los marcadores de peso molecular por SIGMA (Dalton Mark VII). Además de estos marcadores, se emplearon los anticuerpos monoclonales CB49, CB625, CB1, CB312, CB2 y 11G1 para comprobar el peso molecular calculado de las proteínas.

La membrana de transferencia empleada fue el Inmobilon PVDF de Millipore. En la transferencia de las proteínas se empleó papel Whatman 3MM.

BioRad proporcionó los anticuerpos antiinmunoglobulina humana de tipo G conjugados a fosfatasa alcalina así como los sustratos de dicha enzima BCIP/NBT (5-bromo-4-clor-3-indolil fosfato y cloruro de p-nitro azul de tetrazolio). Los anticuerpos de tipo IgM eran de la casa SIGMA.

#### 2.1.5.- EQUIPOS

En la elaboración del medio de cultivo se utilizaron los siguientes aparatos: agitadores (Selecta Giralt), pHmetro (Crison serie 0501), balanza (Mettler p 1210), balanza de precisión (Sartorius Giralt S.A.).

En la inoculación de las muestras para el cultivo de la espiroqueta se utilizó una campana de flujo laminar (Telstar) y para su crecimiento una estufa Rost-Frei (Pacisa).

En la preparación del antígeno se utilizó: centrífuga (Jouan CR 412, Izasa), sonicador (W-380) y evaporador en vacío (Balzers).

En la electroforesis de las proteínas, se emplearon cristales, separadores, cubeta (Mini Protean II) y fuente de alimentación, suministrados por la casa BioRad. La cubeta necesaria para la transferencia de las mismas fue la Mini Trans-blott electrophoretic Transfer Cell, suministrada igualmente por BioRad.

Se utilizó un densitómetro para la lectura de las bandas resultantes del Inmunoblot EC910 equipado con un software EC934 (E-C Apparatus Corporation, Florida, USA).

El espectrofotómetro para la lectura de las microplacas usadas en los enzimoimmunoanálisis, y el lavador automático fue proporcionado por Flow Laboratories (Titertek Multiscan de ocho canales y Titertek Microplaque washer, respectivamente).

Para la visualización de las espiroquetas, se empleó un microscopio de campo oscuro y de fluorescencia (Nikon).

## 2.2.- METODO

### 2.2.1.- CULTIVO DE LAS MUESTRAS CLINICAS

Las muestras clínicas se cultivaron siguiendo los protocolos de Steere y cols (99).

#### 1.- Sangre:

Las muestras de sangre se recogieron en tubos estériles con heparina y se sembraron en cantidades de 0,2 a 0,4 ml en tubos con 5 ml de medio BSKII, sin previa centrifugación. A la semana de la inoculación se realizaba un subcultivo.

#### 2.- Biopsias cutáneas:

Se maceraron en 1 ml de medio y tras dejarlas en reposo durante 3 horas, se sembraban cantidades de 0,1 ml en tubos con 5 ml del medio de cultivo.

#### 3.- LCR:

Se sembró en cantidad de 0,5 a 1ml en medio BSKII.

Todas las muestras clínicas una vez sembradas se incubaban a 33 °C y se observaban en campo oscuro en busca de espiroquetas el 3º y 7º día y luego semanalmente durante 3 meses.

### 2.2.2.- IFI

Tanto para la obtención del antígeno como para la técnica de IFI se siguieron los protocolos de Russell y cols. (111) y Craft y cols. (141).

#### 2.2.2.1.- OBTENCION DEL ANTIGENO

Para la preparación de los portaobjetos empleados en la IFI se utilizó un cultivo temprano de la cepa de Bb. Se partió de un inóculo congelado de la espiroqueta, en el que se observaban antes de su congelación al menos 50 borrelias por campo en el



examen con el objetivo de 40X, de una gota de 20 µl bajo un cubre de 22x22. Se sembró en cuatro tubos de medio BSKII de 10 a 12 gotas de dicho inóculo y se incubó a 33°C en estufa con aire ambiente, de cuatro a cinco días. El adecuado crecimiento se manifestaba por un cambio del color rojo del medio a amarillo-anaranjado.

El cultivo resultante de los cuatro tubos se reunió en un tubo con capacidad de 50 cc, y se centrifugó a 5.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón blanco resultante en una solución de PBS-MgCl<sub>2</sub>-Acida. Se centrifugó de nuevo a 5.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, y se repitió la misma operación dos veces más, hasta completar tres lavados.

Después del último lavado, se resuspendieron los organismos en 5 ml de la misma solución (PBS-MgCl<sub>2</sub>-Acida).

La suspensión de espiroquetas obtenida se diluía 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 en PBS y se examinaba una gota de 20 µl en el microscopio de campo oscuro bajo cubres de 22x22. La dilución adecuada era aquella que mostraba de 0 a 4 borrelias en varios campos utilizando el objetivo de 40X.

Se utilizaron portas de 15 pocillos, que se lavaron previamente con solución jabonosa y, tras ser aclarados, se dejaron secar en la estufa.

Se depositaban alícuotas de 20 µl de la dilución de organismos en cada pocillo, y se dejaban secar los portas hasta el día siguiente en que se guardaban a -70°C hasta su uso.

#### 2.2.2.2.- TECNICA DE IFI

Se analizaron por IFI todos los sueros y LCR recogidos entre Enero de 1987 y Diciembre de 1992, de pacientes con sospecha de infección por Bb. Igualmente se analizaron 50 sueros de donantes

de sangre, obtenidos en el Banco de sangre del Hospital Ramón y Cajal.

Los sueros en estudio se diluían 1/64, 1/128 y 1/256 en PBS-Tween-Acida, y para los LCR se hacían diluciones seriadas partiendo del LCR puro. Para la estandarización de la técnica, y la utilización de las mismas condiciones, en cada ensayo se empleaban los siguientes controles:

- Controles positivos:

- un control positivo de sífilis (FTA-ABS), puro que se consideraba con positividad 4+, y diluido 1/200 con positividad 1+. Este control era suministrado por la casa BioMérieux.

- un suero de un paciente diagnosticado de infección por Bb (procedente de la Clínica Mayo, Rochester, Minnesota), diluido 1/100 que se consideraba de 3+ a 4+ de positividad.

- Control negativo: PBS.

En cada ensayo, se colocaban 20 µl de cada suero y LCR en los pocillos de los portas, previamente fijados con acetona durante 10 minutos, y después de 30 minutos en cámara húmeda a 37°C, se lavaban con PBS pH 7,2 durante 10 minutos. Una vez secos se añadían 20 µl de inmunoglobulina antihumana conjugada con fluoresceína, procediendo con la incubación y el lavado de la misma manera que antes, añadiendo un último lavado de 2 minutos con agua destilada. Una vez secos se añadía una gota de líquido de montaje (glicerol) y bajo un cubreobjetos se observaban los portas en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40X.

Para obtener la dilución a la que debía ser utilizada la inmunoglobulina antihumana conjugada a fluoresceína, se seguía el siguiente procedimiento: se hacían diluciones de la inmunoglobulina seriadas (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, etc). Se utilizaban para cada dilución los controles positivo y negativo anteriormente descritos, y se aplicaba en ellos la IFI. Se leían los portaobjetos empezando por la dilución más baja del

conjugado, y siguiendo los grados de reactividad (del 4+ al negativo). La dilución elegida era aquella que mostrase la reactividad indicada para cada control. El esquema sería el siguiente:

Dilución conjugado	Control -	Control 4+	Control 1+
1:100	<1+	4+	3+
1:200	-	4+	2+
1:400	-	4+	1+
1:800	-	3+	-

En este caso, la dilución elegida sería la 1:400. Cada vez que se utilizaba un conjugado nuevo, se seguía este procedimiento para la estandarización de la técnica.

Se consideraba un suero positivo cuando a la dilución igual o mayor a 1/256 mostraba una fluorescencia 1+. El LCR se consideraban positivo cuando a la dilución igual o mayor a 1/2 mostraba igualmente una fluorescencia de 1+, para hacer comparable la cantidad de IgG que en él existe con la del suero.

### 2.2.3.- ELISA.

Los sueros analizados por ELISA fueron los recogidos entre enero de 1987 y Diciembre de 1992, remitidos al laboratorio por la sospecha de infección por Bb. Se analizaron también 116 sueros de donantes de sangre.

Para el ELISA, se utilizó un kit comercial de la casa MarDx Diagnostics Inc. (Carlsbad, California), que permite analizar anticuerpos antiborrelia de las clases IgM e IgG conjuntamente (IgM & IgG) y por separado.

La cepa de Bb utilizada es la B31, unida a un soporte (microplacas) de pocillos de poliestireno. La técnica consta de los siguientes pasos:

1.- Incubación de las muestras de suero diluídas 1:100 con tampón, en las microplacas con el antígeno, durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Los anticuerpos presentes en los sueros se unirán al antígeno de la borrelia.

2.- Tres lavados de 1 minuto cada uno para eliminar restos de anticuerpos no unidos al antígeno.

3.- Incubación durante 30 minutos con los anticuerpos antiinmunoglobulina humana conjugados a peroxidasa. El conjugado se unirá a los complejos antígeno-anticuerpo que se hayan formado en el primer paso.

4.- Lavado como en el paso 2.

5.- Incubación durante 10 minutos con el sustrato de la peroxidasa.

6.- Incubación durante 2 minutos con una solución del ácido para parar la reacción.

7.- Lectura en espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda.

En cada ensayo se utilizaba un control positivo alto, un positivo bajo y un negativo, suministrados en el kit. Los sueros se analizaban por duplicado, y el control positivo bajo se analizaba por triplicado. Para calcular el resultado de la técnica se calculaba la media de las densidades ópticas de cada suero, y ésta se dividía por el valor de la media de las densidades ópticas de los tres controles positivos bajos. Si resultaba mayor o igual a 1, se consideraba ELISA positivo.

Se realizó ELISA (IgG&IgM) en todos los sueros y aquéllos que resultaban positivos se ensayaban con los ELISAs individuales (IgG independiente de IgM).

El ELISA IgG se realizaba del mismo modo que el completo mientras que el IgM llevaba un paso previo de eliminación de anticuerpos IgG mediante una centrifugación.

#### 2.2.4.- INMUNOBLOT

Se siguió el protocolo de Fister y cols. (142) para la puesta a punto y desarrollo del inmunoblot.

##### 2.2.4.1.- OBTENCION DEL ANTIGENO

Se preparaba 1 litro de medio de Kelly modificado en el que se inoculaban varias alícuotas de la cepa de Bb congelada. Al cabo de 7 días se obtenía un cultivo en el que se observaban aproximadamente 50 espiroquetas por campo (40X). Se distribuía el litro en seis botellas de 250 cc y se centrifugaba el medio a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Una vez eliminado el sobrenadante se resuspendía el botón resultante de cada botella con 15 ml de PBS-MgCl<sub>2</sub>-Acida pH 7,2 por aspirado con pipeta Pasteur, y se centrifugaba de nuevo a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C.

Se repetía el proceso de lavado dos veces más, y al final se resuspendían los botones con la espiroqueta en 6 ml de PBS pH 7,2.

Los 6 ml del cultivo se sonicaban para romper las células.

Tras una centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos, se recogía el sobrenadante que posteriormente se dializaba contra PBS durante una noche en nevera, en agitación.

La solución obtenida se congelaba a -70°C y se liofilizaba, para su conservación hasta su uso.

#### 2.2.4.2.- CARACTERIZACION DEL ANTIGENO

##### 2.2.4.2.1.- Valoración de proteínas

Para medir la concentración de proteínas del extracto antigénico obtenido se utilizó el método de Biuret con reactivos comerciales (BCA\* Protein assay reagent de Pierce) (143).

##### 2.2.4.2.2.- PAGE-SDS

Los geles de poliacrilamida se forman por co-polimerización de acrilamida y bis-acrilamida (N,N'metilen bisacrilamida). El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas por envolvimiento de la estructura de las mismas, confiriendo una carga negativa en proporción a su tamaño. Los geles de poliacrilamida discontinuos están formados por un gel concentrador que permite reunir las proteínas aún en grandes volúmenes de muestra, y un gel separador que permite separar las proteínas previamente concentradas con gran resolución.

La polimerización se realizó según el método de Laemmli (144).

La parte concentradora de los geles se preparó con acrilamida al 4%, ocupando en la zona superior  $1/5$  de la longitud total del gel. La parte inferior separadora, se preparó con acrilamida al 12% y ocupaba las  $4/5$  partes de los geles.

Para la preparación de los geles se montó el sandwich con los cristales utilizando espaciadores de 0,75 mm y se pipeteó la solución del gel separador. Se cubrió la superficie del gel con agua destilada evitando la formación de burbujas de aire y se mantuvo en reposo durante 30 minutos con objeto de permitir la polimerización.

Tras añadir los componentes del gel concentrador sobre el gel separador ya polimerizado, se insertó un peine en el extremo

superior para la formación de los pocillos. Se utilizaron peines de 10 pocillos, y de frente único.

Las muestras liofilizadas se resuspendieron en tampón de tratamiento de muestra a la concentración de 1mg/ml y se calentaron durante 2 minutos a 100°C. Cuando se empleaban los peines de 10 pocillos se cargaban 5 µl de la muestra por pocillo, y 50 µl cuando se utilizaron los de frente único. Se aplicaba sobre el gel además de la muestra unos marcadores preteñidos con la finalidad de observar el avance del frente de muestra, al igual que unos marcadores de peso molecular.

Una vez aplicadas las muestras sobre el gel se llenó la cámara superior y la inferior de la cubeta con el tampón de llenado y se corrió el gel a voltaje constante (200 voltios) durante aproximadamente 30 minutos. Se observaba siempre que llegara el frente a la misma distancia con el fin de hacer la lectura de las bandas más fácil.

Para la visualización de las proteínas los geles se tñeron sumergiéndolos en una solución de azul de Comassie R-250 al 0,125% en ácido acético/metanol/agua (10/40/50) durante una hora y se destñeron con ácido acético/metanol/agua para remover el exceso de tinción (7,5/10/87,5) durante aproximadamente 3 horas.

Para calcular el peso molecular de las proteínas del antígeno obtenido se comparó la movilidad electroforética de las mismas con la movilidad de los patrones de peso molecular comerciales empleados. También se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón: 11G1 (reconoce la proteína Osp-A), CB2 (reconoce la Osp-B), CB1 (contra el antígeno flagelar), CB312 (contra la proteína de 72 kDa), CB49 (contra la de 19 kDa) y CB625 ( contra la de 21 kDa). El revelado se realizó con inmunoglobulinas antiratón conjugadas a fosfatasa alcalina.



### 2.2.4.3.- TECNICA DE INMUNOBLOT

#### 2.2.4.3.1.- Transferencia

Los geles discontinuos de poliacrilamida fueron cargados con 50  $\mu$ l de la concentración del extracto antigénico de 1 mg/ml. Dichos geles fueron polimerizados con peine de frente único de 6,5 cm de longitud. Los 50  $\mu$ l se repartían homogéneamente a lo largo del peine.

El gel conteniendo las proteínas separadas electroforéticamente fue sumergido en 50 ml de tampón de transferencia y se mantuvo en agitación lenta durante 20 minutos con la finalidad de extraer el SDS.

La membrana de transferencia (inmobilón) se humedeció con metanol durante unos segundos y se lavó con agua destilada. Se mantuvo en tampón de transferencia durante 20 minutos. Se preparó un "sandwich" poniendo dos rectángulos de papel Whatman de 7 x 10 cm en los extremos del mismo y entre ellos el gel y un rectángulo de 5,6 x 8 cm de la membrana de transferencia (inmobilón).

Una vez preparado el "sandwich" se colocó éste entre los dos electrodos de la cubeta de transferencia de modo que las proteínas del antígeno separadas electroforéticamente, en su migración hacia el ánodo quedaran retenidas en el immobilón. La cubeta se llenó hasta cubrir el "sandwich" con el tampón de transferencia y se realizó la transferencia a 100 voltios y 250 mA durante una hora.

La membrana se cortó en tiras de 2,5 cm de ancho, una vez realizada la transferencia, y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

#### 2.2.4.3.2.- Revelado

Los sueros analizados por Inmunoblot fueron los recogidos



entre enero de 1990 y junio de 1991, que habían resultado positivos por IFI y/o ELISA. Igualmente se analizaron 20 sueros de donantes de sangre del Banco de Sangre del Hospital Ramón y Cajal, y 20 sueros de pacientes a los que se había solicitado IFI y ELISA, y habían resultado negativos por ambas técnicas.

En cada ensayo se utilizaba un control positivo correspondiente a un paciente con infección por Bb por presentar EM, y un pool de sueros de donantes como control negativo. El procesamiento de los sueros se realizó de la siguiente manera:

1.- Se saturaba cada tira con 1,8 ml de tampón de bloqueo durante una hora, a 37°C.

2.- Se añadían 9 µl de cada suero a analizar al tampón de bloqueo de manera que se obtenía una concentración 1:200. Para cada suero utilizábamos dos tiras, con la finalidad de estudiar los anticuerpos de tipo IgG e IgM presentes.

3.- Seguidamente se lavaban las tiras 4 veces con una solución de suero fisiológico con 0,05% de Tween 20 y una 5ª vez con la solución salina sin el detergente. En cada lavado, se sumergían las tiras durante 5 minutos.

4.- Las tiras se incubaban con los anticuerpos anti IgG y anti IgM humana conjugados a fosfatasa alcalina diluídos 1/1000 durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta. Para cada tira se utilizaba 1 ml de conjugado diluido en tampón de bloqueo.

5.- Se procedía a los mismos lavados que en el paso 3.

6.- Se incubaban las tiras con el sustrato de la enzima (NBT y BCIP) durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación lenta. El NBT se preparaba disolviendo 30 mg de cloruro de p-nitro azul de tetrazolio en 1 ml de N,N-Dimetilformamida al 70%. Para la preparación del BCIP, se disolvían 15 mg de 5-bromo-4-

clor-3-indolil fosfato (BCIP) en 1 ml de N,N-Dimetilformamida. Ambas soluciones se conservaron a 4°C y en el momento del revelado 100 µl de cada solución se añadían a 10 ml de tampón carbonato (0,1M bicarbonato sódico, 1mM cloruro magnésico, pH 9,8), obteniéndose de esta manera el sustrato de la fosfatasa alcalina.

7.- Finalmente las tiras se lavaban una última vez con la solución salina y se dejaban secar al aire, conservándose a temperatura ambiente.

#### 2.2.4.3.3.- Cuantificación de las bandas

Las bandas resultantes del inmunoblot fueron cuantificadas por lectura en densitómetro. Para ello fueron fotocopiadas en papel de transparencia (Staedtler Lumocolor Film) y leídas en un Densitómetro de Transmisión EC910 equipado con un software EC934 (E-C Apparatus Corporation, Florida, USA).

La intensidad de reacción de los anticuerpos presentes en el suero frente a cada proteína, correspondía al área bajo la curva que leía el densitómetro al pasar por cada una de las bandas del inmunoblot. Considerábamos la banda de 41 kDa del control positivo con una densidad del 100% y calculábamos el valor de cada una de las bandas de los demás sueros en referencia a este valor.

#### 2.2.5.- VALORACION DIAGNOSTICA DE LOS ENFERMOS

La valoración de los enfermos se basó en los criterios de diagnóstico de infección por Bb del CDC (the Centers for Disease Control, USA), parcialmente ampliados. Incluimos el linfocitoma y la ACA como manifestaciones tardías de la enfermedad (145). El CDC define caso de enfermedad de Lyme aquel paciente con EM, o que presenta una manifestación dermatológica, articular, neurológica o cardíaca admitida como manifestación tardía (tabla), con exclusión de otras enfermedades y con confirmación

del laboratorio. Esta confirmación hace referencia a la existencia del aislamiento de la espiroqueta a partir de una muestra de tejido o líquido orgánico, o la detección de anticuerpos de tipo IgG o IgM en el suero o LCR del paciente, o al cambio del título de estas inmunoglobulinas de la fase aguda a la convaleciente.

Las manifestaciones tardías admitidas por el CDC son las siguientes:

1.- CUTANEAS: EM. Hemos incluido la ACA y linfocitoma.

2.- ARTICULARES: Ataques fugaces (semanas o meses) de artritis (mono u oligoarticular). Algunas veces pueden seguirse de artritis crónica mono u oligoarticular.

No se consideran:

- Artritis crónica progresiva no precedida de episodios fugaces.

- Poliartritis crónica simétrica.

- Síndromes de fibromialgias, artralgiás, mialgias aislados.

3.- NEUROLOGICAS:

- Meningitis linfocitaria.

- Neuritis craneal (principalmente parálisis facial).

- Radiculoneuropatía.

- Encefalomiелitis con evidencia serológica en LCR.

No se consideran:

- Parestesias.

- Cefalea.

- Astenia.

4.- CARDIOVASCULARES:

- Bloqueos A-V de 2º ó 3º grado de comienzo agudo, y que desaparecen en días o semanas. Algunas veces se asocian a miocarditis.

No se consideran:

- Bloqueos de rama.

- Palpitaciones.

- Bradicardias.

- Miocarditis aislada.

Atendiendo a estos criterios, se clasificaron los pacientes con serología positiva en tres grupos:

- 1.- Pacientes con criterios de BL (grupo I).
  - 2.- Pacientes sin criterios de BL (grupo II).
  - 3.- Pacientes con serología positiva falsa (grupo III).
- Estos pacientes presentaban otra etiología que pudiera explicar los síntomas.

Un especialista en enfermedades infecciosas realizaba la valoración clínica de los enfermos.

#### 2.2.6.- VALORACION DE LAS TRES TECNICAS SEROLOGICAS UTILIZADAS.

Para el diseño del protocolo de recogida de datos clínicos y serológicos de los pacientes, y posterior análisis de los mismos, se emplearon el programa informático de Bioestadística Sigma Plus (Horus Hardware, S.A.), y el PRESTA V2.2. Se utilizaron el índice kappa y la regresión logística en el análisis de las técnicas serológicas.

En la evaluación de las características generales de los pacientes (epidemiología, manifestaciones clínicas, etc.) se empleó el test exacto de Fisher con una  $p < 0,05$  para considerar diferencias estadísticamente significativas.

##### 2.2.6.1.- Índice kappa

En el análisis estadístico de las técnicas serológicas de IFI y ELISA se utilizó el índice kappa ( $k$ ) (146), para evaluar la concordancia entre ambas técnicas. El índice kappa se representa como la cantidad de concordancia que quede después de eliminar la debida al azar ( $P_o - P_e$ ) dividida por la máxima cantidad de tal acuerdo extra que podría ocurrir.

Sea  $P_o$  la proporción de acuerdos observados y  $P_e$  la proporción de acuerdos esperados por azar,

$$k = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

donde  $P_o - P_e$  es el acuerdo observado no debido al azar, y  $1 - P_e$  el máximo acuerdo posible no debido al azar.

La escala de valoración del índice  $k$  fue propuesta por Landis y Koch (147), y se clasifica en las siguientes categorías:

kappa	grado de concordancia
<0,00	pobre
0,00-0,20	ligera
0,21-0,40	mediana
0,41-0,60	moderada
0,61-0,80	sustancial
0,81-1	casi perfecta

#### 2.2.6.2.- Regresión logística

La regresión logística compara los datos de dos grupos de individuos, y obtiene un modelo según el cual se clasifican lo mejor posible cada individuo en el grupo que le corresponde. Uno de los grupos es el de pacientes con criterios de BL y el otro es el grupo control. Para analizar qué control es el más adecuado, se realizaron dos estudios, tanto para la cepa B31 como para la Esp-1. En uno se utilizó como control un grupo de donantes de sangre (supuestamente sanos) y en el otro un grupo de enfermos pero sin diagnóstico de BL.

##### ESTUDIO 1.-

Se clasificaron los individuos en dos grupos:

- Grupo A: donantes de sangre, y
- Grupo B: pacientes con criterios de BL.

Si  $p$  es la probabilidad de pertenecer al grupo B y  $q$  la de pertenecer al grupo A, el modelo de regresión logística toma la forma:

$$\ln (p/q) = a + bx_1 + cx_2 + \dots + zx_n = Y$$

donde  $\ln$  significa logaritmo neperiano,  $a...z$  son los coeficientes y  $x_1...x_i$  son variables, que corresponden a los valores de cada una de las bandas del inmunoblot. La probabilidad por tanto de que un paciente padezca la enfermedad vendría dada por la fórmula:

$$p = 1/(1+e^{-Y})$$

Una vez estimados los coeficientes por el método de máxima verosimilitud, se evaluó el modelo, cuantificando el acierto en la clasificación.

Para llegar a obtener los coeficientes de la fórmula anterior se siguieron los siguientes pasos:

1.- Se calculó la media de los resultados de la lectura en densitómetro de las bandas en cada uno de los grupos.

2.- Se eliminaron del análisis aquellas bandas cuya media en los dos grupos fuera 0 o muy próximo a 0, pues significaría que no tienen valor discriminatorio entre los dos grupos.

3.- Se realizaron los contrastes de hipótesis de no significación de cada coeficiente (por la prueba de Wald); asimismo se cuantificó la bondad del ajuste del modelo por la prueba del logaritmo de la razón de verosimilitudes (148).

4.- Para obtener el mejor modelo en el estudio de la cepa B31 se siguió la estrategia hacia atrás, que consiste en ir eliminando del análisis aquellas bandas con  $p$  más alta, hasta conseguir que todas fueran menores que 0,05. En el inmunoblot con la cepa Esp-1 se siguió la estrategia hacia adelante, consistente en comenzar con la variable cuya  $p$  fuera más baja, e ir añadiendo la siguiente con  $p$  menor.

Una vez calculadas los coeficientes, para saber si un paciente pertenece al grupo B, bastaría con sustituir los valores de sus bandas, y calcular  $Y$ . De la fórmula anterior se deduce:

$$p/q = e^Y$$

Así, si Y es positivo, p sería mayor que q y por lo tanto la probabilidad de que el paciente perteneciera al grupo B (pacientes con criterios de BL) sería mayor que la de que perteneciera al grupo A.

## ESTUDIO 2.-

Se clasificaron los pacientes de la siguiente manera:

- Grupo 1: Pacientes sin infección por Bb (pacientes positivos falsos y pacientes con serología negativa para Bb por IFI y ELISA, y por lo tanto no diagnosticados de infección por Bb).
- Grupo 2: Pacientes con criterios de infección por Bb.

Se aplicó regresión logística de la misma manera que la descrita en el estudio 1.

### 2.2.6.3.- Recogida de datos de los pacientes.

A la vez que se enviaba el resultado de las técnicas serológicas a los médicos remitentes, se enviaba una copia del modelo de recogida de datos del enfermo, solicitando la cumplimentación del mismo y el envío de una nueva muestra.

A continuación se describe el protocolo seguido para la recogida de los datos de cada paciente:

#### RECOGIDA DE DATOS CLINICOS DE PACIENTES CON SOSPECHA DE INFECCION POR *Borrelia burgdorferi*

##### \* DATOS DEL PACIENTE:

NOMBRE Y APELLIDOS:

EDAD:

HOSPITAL:

NOMBRE DEL MEDICO RESPONSABLE:

TELEFONO DE CONTACTO:

SEXO:

PROVINCIA:

SERVICIO:

**\* ANTECEDENTES EPIDEMIOLOGICOS:**

- 1.- HISTORIA DE PICADURA DE GARRAPATA: SI ( ), NO ( )  
CAPITAL, PUEBLO O/Y PROVINCIA:  
TIEMPO TRANSCURRIDO HASTA LA APARICION DE LOS SINTOMAS:
- 2.- AMBIENTE RURAL: SI ( ), NO ( )
- 3.- CONTACTO CON ANIMALES: SI ( ), NO ( )
- 4.- OTROS ANTECEDENTES EPIDEMIOLOGICOS:

**\* SINTOMAS O SIGNOS CLINICOS:**

- 1.- CUTANEOS: TIEMPO DE EVOLUCION:  
ERITEMA MIGRATORIO: SI ( ), NO ( )  
NUMERO DE LESIONES:  
LOCALIZACION:  
OTRAS MANIFESTACIONES CUTANEAS:
- 2.- ARTICULARES: TIEMPO DE EVOLUCION:  
ARTRITIS: SI ( ), NO ( )  
LOCALIZACION DE LA ARTRITIS:  
CARACTERISTICAS DE LA ARTRITIS:  
OTRAS MANIFESTACIONES ARTICULARES:
- 3.- NEUROLOGICOS: TIEMPO DE EVOLUCION:  
MENINGITIS LINFOCITARIA: SI ( ), NO ( )  
NEURITIS CRANEAL: SI ( ), NO ( )  
RADICULONEUROPATIA: SI ( ), NO ( )  
ENCEFALOMIELITIS: SI ( ), NO ( )  
NEUROPATIA PERIFERICA: SI ( ), NO ( )
  - POLINEUROPATIA: SI ( ), NO ( )
  - NEUROPATIA POR ATRAPAMIENTO: SI ( ), NO ( )
  - MONONEURITIS MULTIPLE: SI ( ), NO ( )OTRAS MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS:
- 4.- CARDIACOS: TIEMPO DE EVOLUCION:  
BLOQUEO A-V: SI ( ), NO ( )  
GRADO:  
OTRAS MANIFESTACIONES CARDIACAS:

**\* OTROS SIGNOS O SINTOMAS ATRIBUIDOS A LA ENFERMEDAD:****\* ¿SE HAN DESCARTADO RAZONABLEMENTE OTRAS ETIOLOGIAS QUE PUEDAN**



---

\* DATOS DE LABORATORIO DE INTERES:

- SANGRE: VDRL:  
FTA-ABS:  
ANA:  
FR:
- LCR:
- LIQUIDO SINOVIAL:
- BIOPSIA DE PIEL:

\* ESTUDIOS CLINICOS ALTERADOS: (E.C.G., RADIOLOGIA, ETC.)

\* TRATAMIENTOS RECIBIDOS:

\* EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD:

\* TIEMPO DE SEGUIMIENTO:

\* IMPRESION CLINICA:

RECOGIDA DE DATOS SEROLOGICOS

- Fecha:
- Suero nO:
  - IFI: Positiva/Negativa; Título:
  - ELISA (IgG&IgM): Positiva/Negativa; Título:
  - ELISA (IgG): Positiva/Negativa; Título:
  - ELISA (IgM): Positiva/Negativa; Título:
  - Inmunoblot:

	Capta/no capta;	Densidad:
- 72 kDa:	"	"
- 63 kDa:	"	"
- 60 kDa:	"	"
- 50 kDa:	"	"
- 45 kDa:	"	"
- 41 kDa:	"	"
- 38 kDa:	"	"
- 36 kDa:	"	"
- 34 kDa:	"	"
- 31 kDa:	"	"
- 21 kDa:	"	"
- 19 kDa:	"	"

### III. RESULTADOS

### 3.1.- Cultivo de muestras clínicas para el aislamiento de la espiroqueta

Se sembraron un total de 20 muestras: 3 biopsias cutáneas, 11 muestras de sangre y 6 LCR.

De las biopsias cutáneas, una procedía de un paciente con ACA, otra de un paciente con EM, y la tercera era de un paciente que presentaba nódulos cutáneos (no cumplía criterios de BL). Sólo el paciente con ACA había recibido tratamiento antibiótico antes de la obtención de la biopsia.

Se sembraron las siguientes muestras de sangre: 5 muestras de 3 pacientes con EM, una muestra de un paciente con ACA, 2 muestras de 2 pacientes sin criterios de BL, 2 muestras de un paciente positivo falso, y una de un paciente con afectación neurológica aceptada como criterio de BL (neuritis). Uno de los pacientes con EM había recibido tratamiento antes de obtener la sangre. Lo mismo sucedió con el paciente con ACA. De los dos pacientes sin criterios de BL uno había recibido tratamiento antibiótico, al igual que el paciente con serología positiva falsa.

El LCR se obtuvo de los siguientes pacientes: un paciente con EM, un paciente con meningitis que había sido tratado previamente, un paciente con neuritis, dos pacientes sin criterios de BL y un paciente con serología positiva falsa y que había recibido tratamiento antes de la obtención del LCR.

En ninguno de los casos se consiguió aislar la cepa española de Bb.

### 3.2.- Características de los pacientes

Se obtuvieron un total de 1991 muestras (1631 sueros y 360 LCR), pertenecientes a 1500 pacientes. De éstos, 136 (9%) tuvieron serología positiva para Bb por IFI y/o ELISA (IgG&IgM), o presentaron EM. De acuerdo con la clasificación de los pacientes, descrita en el apartado de métodos, 64 (47%) cumplían criterios de BL (grupo I), 48 (35%) no los cumplían (grupo II) y 24 (18%) eran positivos falsos (grupo III).

Para evaluar algunas de las características de los pacientes y analizar si hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos, se estudiaron un total de 100 pacientes con serología negativa para Bb (seleccionados mediante una randomización), considerándolos como controles negativos.

### 3.2.1.- Distribución geográfica de los casos

Se obtuvieron 7 casos de pacientes con criterios de BL (grupo I) en 1987, 13 en 1988, 19 en 1989, 12 en 1990, 9 en 1991 y 4 en 1992 (el número de muestras analizadas en estos años: 160 en 1987, 352 en 1988, 439 en 1989, 373 en 1990, 394 en 1991 y 273 en 1992). Los pacientes pertenecían a las provincias de Madrid (32), Segovia (3), Avila (2), Valladolid (1), Guadalajara (3), Barcelona (4), Pamplona (1), Asturias (8), La Coruña (2), Badajoz (1), Málaga (3), Córdoba (2), Valencia (1).

Los casos del grupo II se distribuyeron por años de la siguiente manera: 5 en 1988, 10 en 1989, 12 en 1990, 15 en 1991 y 6 en 1992. Pertenecían a las provincias de Madrid (30), Guadalajara (1), Barcelona (3), Pamplona (1) y Zaragoza (2), Asturias (2), La Coruña (2), Lugo (1), Badajoz (2) y Málaga (4).

Los pacientes con serología positiva falsa (grupo III), con otra etiología que pudiera justificar los síntomas se obtuvieron en los siguientes años: 1 en 1987, 6 en 1988, 6 en 1989, 5 en 1990, 5 en 1991 y 1 en 1992. Veintitrés de ellos pertenecían a la provincia de Madrid y uno a La Coruña.

Del grupo utilizado como control negativo, 55 procedían de la provincia de Madrid, y el resto se repartían entre las provincias de Guadalupe (8), Segovia (2), La Coruña (3), Orense (1), Asturias (6), Vitoria (4), Barcelona (3), Zaragoza (2), Pamplona (1), Málaga (9), Burgos (2), Murcia (1), Córdoba (2) y Albacete (1).

### 3.2.2.- Edad de los pacientes y distribución por sexo

La edad media de los 64 pacientes con criterios de BL fue de 43 años, con desviación típica de 20 y rango con un mínimo de 6 y máximo de 84 (tabla 3.1.). El 62,5% (40) de ellos eran varones y el 37,5% (24) mujeres (figura 3.1.).

Los pacientes sin criterios de BL tenían una edad media de 39 años, con desviación típica de 19 y rango con un mínimo de 5 años y máximo de 83 tabla (3.1.). Veintiocho de ellos eran varones (58%) y 20 mujeres (42%) (figura 3.1.).

La edad media de los pacientes con serología falsa positiva fue de 44 años, con desviación típica de 14 y rango con un mínimo de 23 años y máximo de 65 (tabla 3.1.). El 87,5% de ellos eran varones (21) y el 12,5% mujeres (3) (figura 3.1.).

El número de varones en el grupo de pacientes con serología negativa fue de 42 y el de mujeres 58, habiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los 136 pacientes con serología positiva (hubo más varones en este último grupo).

#### DISTRIBUCION POR EDADES DE LOS PACIENTES

INTERVALO DE EDAD	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
0-9	1	1	0
10-19	4	4	0
20-29	13	11	2
30-39	8	7	4
40-49	6	6	1
50-59	7	4	6
60-69	8	5	2
>69	7	3	0

Tabla 3.1.- Distribución por edades de los pacientes.

### DISTRIBUCION POR SEXO DE LOS PACIENTES

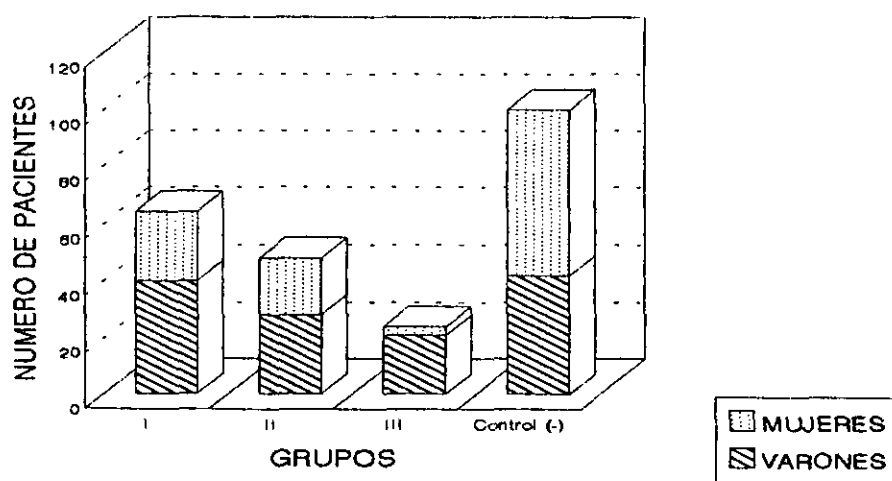


Figura 3.1.- Distribución por sexo de los pacientes (grupo I,II y III de pacientes con serología positiva para Bb y grupo control con serología negativa).

#### 3.2.3.- Procedencia de los pacientes por servicios médicos

La mayoría (36%) de los pacientes con serología positiva para Bb fueron atendidos en un servicio de Neurología (49/136). Enfermedades Infecciosas o Microbiología clínica atendió al 32% de los pacientes (43/136). El 14% de los pacientes provenían de un servicio de Dermatología (19/136). El resto de los casos se distribuyó entre los servicios de Medicina Interna (10%), Medicina Preventiva (3%), Reumatología (2%), Pediatría (2%), Cardiología (1%) y Oftalmología (1%) (Tabla 3.2.).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en cuanto a la procedencia por servicios médicos entre los distintos grupos de pacientes con serología positiva, así como entre el grupo de pacientes con serología positiva (136 pacientes) y el total de pacientes utilizados como controles negativos (con serología negativa).

**Nº DE CASOS CON SOSPECHA DE INFECCION  
POR Bb**

SERVICIO	Grupo I nº (%)	Grupo II nº (%)	Grupo III nº (%)	Total nº (%)	Control nº (%)
Neurología	26 (40)	16 (33)	7 (29)	49 (36)	30 (30)
Infecc-Micro.	16 (25)	12 (25)	15 (62)	43 (32)	26 (26)
Dermatología	11 (17)	7 (14,5)	1 (4)	19 (14)	24 (24)
M. Interna	5 (8)	8 (17)	0 (0)	13 (9,5)	12 (12)
M. Preventiva	2 (3)	2 (4)	0 (0)	4 (3)	1 (1)
Reumatología	2 (3)	1 (2)	0 (0)	3 (2)	2 (2)
Pediatría	1 (1,5)	2 (4)	0 (0)	3 (2)	3 (3)
Cardiología	1 (1,5)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)	0 (0)
Oftalmología	0 (0)	0 (0)	1 (4)	1 (0,7)	0 (0)
Hematología	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
Digestivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
<b>TOTAL</b>	<b>64</b>	<b>48</b>	<b>24</b>	<b>136</b>	<b>100</b>

Tabla 3.2.- Procedencia de los pacientes y del grupo control por servicios médicos.

#### 3.2.4.- Datos epidemiológicos

El 51% de los 136 pacientes con serología positiva para Bb tuvieron datos epidemiológicos que justificaran la sospecha de infección por Bb (figura 3.2.).

De los 136 casos, 21 (16%) relataron picadura de garrapata, 48 (36%) vivían en ambiente rural y 20 (15%) tenían contacto con animales. El resto (10%) refirió actividades al aire libre como paseos por el campo y caza, actividades agrícolas, de jardinería y ganaderas. Además hubo un 4% de los enfermos (6 casos) que refirieron picadura de insectos como antecedentes epidemiológico.

En el grupo de pacientes utilizados como control negativo el 1% de los casos relató picadura de garrapata, el 22% vivía en ambiente rural y el 17% tuvo contacto con animales. Hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en cuanto a la frecuencia de picadura de garrapata entre el grupo de pacientes con serología positiva (136 pacientes) y el control negativo, pero no en cuanto al ambiente rural y el contacto con animales ( $p > 0,05$ ).

### DATOS EPIDEMIOLOGICOS DE LOS PACIENTES

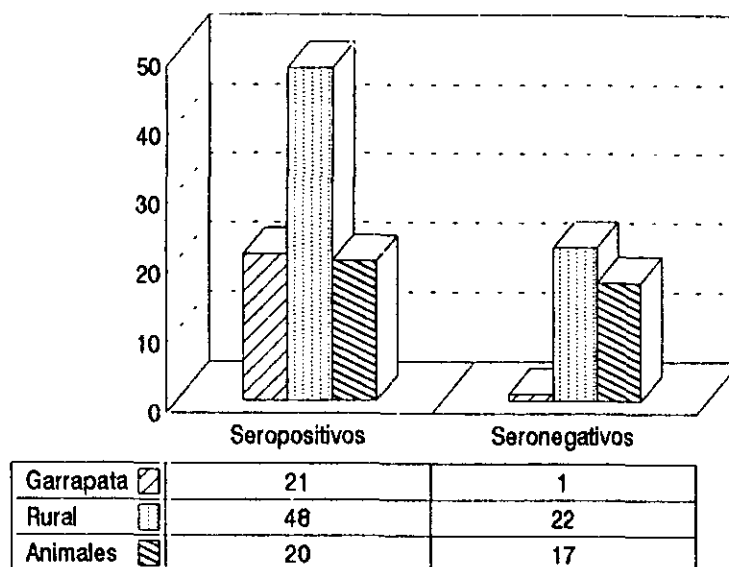


Figura 3.2.- Datos epidemiológicos más importantes de los pacientes con serología positiva para Bb y del grupo control.

#### 3.2.5.- Manifestaciones clínicas

##### 3.2.5.1.- Grupo I

Entre los 64 pacientes con criterios de BL, 17 (26,5%) presentaron EM, dos sufrieron una ACA (3%) y hubo un paciente con linfocitoma (1,5%). De los 17 pacientes con EM, diez lo tuvieron como única manifestación. En los 7 casos restantes, tres presentaron además síntomas articulares, tres manifestaciones neurológicas y en un paciente coincidió el EM con síntomas articulares y neurológicos.

En los pacientes con manifestaciones cutáneas, el tiempo medio transcurrido desde el comienzo de los síntomas y la obtención del primer suero fue de 17 días con un rango con mínimo de 2 días y máximo de 2 meses. Los pacientes con ACA tuvieron un tiempo de evolución de 1 mes y 3 meses respectivamente. Se realizaron 8 biopsias cutáneas, de las que 2 correspondían a EM, dos eran de los pacientes con ACA, y una del paciente con linfocitoma. En todos los casos el resultado fue patológico.



Presentaron artritis 18 de los pacientes del grupo I (28%). Fueron en su mayoría artritis monoarticular u oligoarticular; sólo hubo un caso con una artritis poliarticular intermitente de pequeñas articulaciones, similar a la artritis reumatoide. La articulación más afectada fue la rodilla (11 casos), seguida del tobillo (7), muñeca (4), hombro y mano que afectaron a 2 pacientes, y codo, cadera y pie con un caso cada una de ellas. Seis pacientes tuvieron manifestaciones neurológicas además de las articulares.

El tiempo medio desde el comienzo de los síntomas articulares de estos pacientes fue de 2 años, con mínimo de 2 días y máximo de 16 años. Siete pacientes (11%) referían artralgiás de características inespecíficas. Se tomaron dos muestras de líquido sinovial de pacientes con sintomatología articular y en ambas se detectaron cambios inflamatorios.

Cuarenta (62,5%) de los 64 pacientes con criterios de BL presentaron afectación neurológica, que como única afectación apareció en 30 pacientes. La manifestación más frecuente fue la meningitis linfofocitaria. También fue frecuente la afectación de pares craneales, fundamentalmente la parálisis facial y la afectación del sistema nervioso periférico como polirradiculopatía y mononeuritis múltiple. Dos enfermos presentaron la llamada "triada clásica" (meningitis-neuritis craneal-polirradiculopatía). El tiempo medio de evolución de estos pacientes desde el comienzo de los síntomas fue de aproximadamente un año (mínimo 10 días y máximo 12 años).

El LCR fue estudiado en 27 pacientes y resultó patológico en 17 de ellos (63%).

Hubo dos casos (3%) de afectación cardiológica, ambos con bloqueo atrio-ventricular. Uno de ellos presentó además artritis y parálisis facial bilateral. El tiempo medio de evolución de estos pacientes fue de 6 años, con mínimo de 1 mes y máximo de 12 años.

Las manifestaciones clínicas de los pacientes con criterios de BL se muestran en la tabla 3.3.

MANIFESTACIONES CLINICAS	Nº DE PACIENTES GRUPO I	
	Nº	(%)
CUTANEAS	20	(31%)
EM	17	
ACA	2	
Linfocitoma	1	
ARTICULARES	18	(28%)
Artritis	18	
NEUROLOGICAS	40	(62,5%)
Meningitis	14	
Meningitis-encefalitis	2	
Neuropatía craneal	11	
Parálisis facial	10	
Polirradiculopatía	13	
"Triada clásica"	2	
Neuropatía periférica	12	
CARDIOLOGICAS	2	(3%)
Bloqueo atrioventricular	2	

Tabla 3.3.- Manifestaciones clínicas de los pacientes con criterios de BL.

Se estudió la presencia de ANA en el suero de 42 pacientes del grupo I. Sólo hubo un caso con ANA positivos aunque su clínica no correspondía a la de un lupus eritematoso sistémico. De los 45 pacientes a los que se realizó el FR, hubo 6 cuyo resultado fue positivo. Ninguno de ellos cumplía criterios de artritis reumatoide.

Los pacientes pertenecientes al grupo control (con serología negativa) presentaban en un 38% manifestaciones cutáneas, en un 70% articulares, en un 32% neurológicas y en un 29% cardiológicas. La frecuencia de manifestaciones articulares y cardiológicas fue mayor en el grupo control que en el de pacientes con criterios de BL de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), mientras que las manifestaciones neurológicas fueron más frecuentes en el grupo de pacientes con BL ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las manifestaciones cutáneas ( $p > 0,05$ ).

Considerando sólo las manifestaciones aceptadas como criterios de BL se observó diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la frecuencia de aparición de las manifestaciones neurológicas que fue mayor en el grupo de pacientes con los criterios de BL. En lo referente a las manifestaciones articulares, éstas fueron más frecuentes en el grupo control de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). No se observaron estas diferencias en la frecuencia de la afectación cardiológicas ( $p > 0,05$ ).

#### 3.2.5.2.- Grupo II

Hubo 48 pacientes con serología positiva para Bb, pero cuyas manifestaciones clínicas no cumplían los criterios de BL. No se diagnosticó otra enfermedad que pudiera justificar los síntomas. Dieciséis de los 48 pacientes tuvieron manifestaciones cutáneas (33%), de las cuales 6 (37,5%) correspondían a morfea. Se realizó biopsia cutánea en 5 de los 16 pacientes (3 morfeas), resultando todas ellas patológicas.

Los síntomas articulares como las artralgias, no aceptadas por el CDC como criterio de infección por Bb, afectaron como única manifestación a 8 pacientes (17%).

Veintiún pacientes tuvieron como única manifestación la neurológica (44%). Cuatro pacientes tuvieron además alguna lesión cutánea, y uno presentó manifestaciones neurológicas, cutáneas y cardiológicas. Entre los enfermos con sintomatología neurológica hubo 7 casos de esclerosis múltiple.

Un paciente presentó una pericarditis con derrame sin que pudiera demostrarse otra etiología. El resto de los pacientes presentaban una clínica inespecífica con fiebre y cefalea, y uno formaba parte de un estudio de seroprevalencia realizado en la Rioja.

Las manifestaciones clínicas de los pacientes sin criterios de BL se detallan en la tabla 3.4.

MANIFESTACIONES CLINICAS	Nº PACIENTES GRUPO II	
	Nº	(%)
CUTANEAS	16	(33%)
ARTICULARES	12	(25%)
NEUROLOGICAS	25	(52%)
Cerebro-vascular	3	
Demencia	3	
Mielopatía	2	
Esclerosis múltiple	7	
Otras	10	
CARDIOLOGICAS	2	(4%)

Tabla 3.4.- Manifestaciones clínicas del grupo II.

Los resultados en cuanto a los ANA y FR fueron los siguientes: de los 33 pacientes a los que se realizó ANA, 3 fueron positivos. Cuatro de los 35 pacientes a los que se realizó FR fueron positivos. Ninguno de ellos cumplía criterios diagnósticos de lupus eritematoso diseminado ni de artritis reumatoide.

### 3.2.5.3.- Grupo III

Veinticuatro pacientes fueron clasificados como positivos falsos por tener una serología positiva para Bb, y haber otra etiología que pudiera justificar los síntomas. De los 24 pacientes, 6 (25%) tuvieron RPR y FTA-Abs positivo en sucesivos sueros recogidos a lo largo del tiempo, 5 (21%) fueron diagnosticados de fiebre botonosa mediterránea, 4 (17%) fueron VIH positivo, 4 (17%) fueron diagnosticados de tuberculosis, 3 (12,5%) de fiebre Q, y el resto fueron pacientes con brucelosis, rabdomiosarcoma embrionario de meninges, neoplasia de pulmón, mononucleosis infecciosa, meningitis criptocócica y síndrome de Eaton-Lambert. En dos ocasiones coincidió un FTA-Abs positivo con una fiebre botonosa mediterránea, y en una con un VIH positivo. También un paciente sufrió una tuberculosis y una meningitis criptocócica simultáneamente (tabla 3.5.).

### NO PACIENTES POSITIVOS FALSOS

ETIOLOGIA	Nº	(%)
SIFILIS	6	(24%)
FIEBRE BOTONOSA MEDITERRANEA	5	(21%)
VIH	4	(17%)
TUBERCULOSIS	4	(17%)
FIEBRE Q	3	(12,5%)
BRUCELOSIS	1	(4%)
MONONUCLEOSIS INFECCIOSA	1	(4%)
MENINGITIS CRIPTOCOCICA	1	(4%)
RABDOMIOSARCOMA	1	(4%)
NEOPLASIA PULMON	1	(4%)
S. EATON-LAMBERT	1	(4%)

Tabla 3.5.- Etiología de los pacientes con serología positiva falsa.

Sólo uno de los siete pacientes a los que se realizó ANA fue positivo. El mismo resultado hubo con el FR.

#### 3.2.5.3.1.- Estudio de pacientes con tuberculosis

Debido al alto porcentaje de pacientes con serología positiva para Bb que fueron diagnosticados de tuberculosis, y ante la alta incidencia de tuberculosis en nuestro país, se realizó un estudio para determinar la posible reacción cruzada entre ambas etiologías. Con este objetivo se realizó la detección de anticuerpos frente a Bb en el suero de 50 pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo. Las técnicas empleadas fueron ELISA e inmunoblot. La detección de anticuerpos frente a Mycobacterium tuberculosis se realizó mediante un ELISA de la casa comercial ANDA Biologicals. Se consideraba positivo cuando el título obtenido era igual o mayor a 300 Unidades/ml.

De los 50 sueros, 11 fueron ELISA positivo para Bb. Tres de ellos tuvieron RPR positivo, y fueron excluidos del estudio. De los 8 sueros con ELISA (IgG&IgM) positivo (17%), todos excepto uno fueron positivos en el ELISA para tuberculosis. En la tabla 3.6. se describen los resultados del ELISA para tuberculosis y para Bb en estos sueros, así como la localización de la tuberculosis en los pacientes.

NO	Localización tuberculosis	Serología TBC unidades/ml	Serología Lyme		
			IgG&IgM	IgM	IgG
1	Pulmonar	< 100	2.17	<1	1.34
2	"	> 350	1.81	<1	<1
3	"	> 900	1.01	<1	<1
4	"	350	1.01	<1	<1
5	Peritoneal	300	1.21	<1	<1
6	Esquelética	>1500	2.22	<1	1.67
7	Pleural	> 600	1.66	<1	<1
8	Miliar	> 525	2.45	<1	<1

Tabla 3.6.- Características de los pacientes con tuberculosis y serología positiva para Bb.

### 3.3.- Serología

#### 3.3.1.- IFI y ELISA

Se obtuvieron un total de 1631 sueros correspondientes a 1500 pacientes, en el período comprendido entre enero de 1987 y diciembre de 1992. Los sueros fueron analizados por IFI y ELISA completo (IgG&IgM). Se consideró IFI positivo cuando se obtenía un título igual o mayor a 1/256, y ELISA positivo cuando se obtenía un valor igual o mayor que 1, como se ha descrito en el apartado de métodos. Aquellos sueros con un ELISA (IgG&IgM) positivo se analizaban por ELISA individualizado, que detectaba anticuerpos de tipo IgG e IgM por separado.

Fueron seleccionados 136 pacientes de los 1500 analizados, por poseer algún suero positivo por IFI y/o ELISA (IgG&IgM) o por presentar EM. Se obtuvieron 311 sueros pertenecientes a estos 136 pacientes, de los cuales 173 eran sueros de pacientes del grupo I, 86 de pacientes del grupo II y 52 de pacientes del grupo III.

#### 3.3.1.1.- Resultados de IFI y ELISA en la totalidad de los sueros de los pacientes.

Globalmente, 228 de los 311 sueros (73%) fueron IFI positivo y 175 (58,5%) ELISA (IgG&IgM) positivo (12 sueros no se analizaron por ELISA). Ambas fueron positivas en 151 ocasiones (50,5%), y las dos fueron negativas en 54 sueros (18%).

En el grupo I, de los 173 sueros, 130 tuvieron una IFI positiva (75%). La mayoría de los títulos de IFI (60%) fue de 1/256, el 23% de los sueros (30) alcanzó el título de 1/512, el 14% (18) presentó una titulación de 1/1024 y sólo el 3% (4) llegó a un título de 1/2048 (tabla 3.7.).

De los 173 sueros, 107 tuvieron un ELISA (IgG&IgM) positivo (62%). IFI y ELISA fueron positivas en el 58% de los casos (99/170), y negativas en el 19% de los sueros (32/170) (tabla 3.8.). De 102 sueros que resultaron ELISA completo positivo (5 sueros no se analizaron por ELISA individual), 67 (66%) fueron ELISA IgG positivo, 17 (17%) fueron ELISA IgM positivo, 23 resultaron tanto IgG como IgM negativos (22%) y 6 (6%) positivos (tabla 3.9.).

De los 47 sueros de los pacientes con EM, pertenecientes al grupo I, 35 (74,5%) fueron IFI positivo, 30 (67%) ELISA (IgG&IgM) positivo (dos sueros no se analizaron por esta técnica), el 67% (30/45) tuvieron IFI y ELISA positivo, y el 22% (10/45) IFI y ELISA negativo (tabla 3.8.).

El grupo II de pacientes sin criterios de borreliosis, el 70% de los sueros (60/86) fueron IFI positivo; de ellos 40 (67%) poseían título de 1/256, 13 (22%) de 1/512 y 7 (12%) de 1/1024 (tabla 3.7.). El 61% de los sueros (47/77) fueron ELISA (IgG&IgM) positivo, y fueron los dos positivos en 36 sueros (47%) y negativos en 13 sueros (17%) (tabla 3.8.). El ELISA IgG fue positivo en 28 de los 47 sueros (60%), el IgM en 5 pacientes (11%), y en 15 fueron los dos ELISAs individuales negativos (32%) (tabla 3.9.).

En el grupo de pacientes con serología positiva falsa (grupo III) se obtuvieron los siguientes valores: de los 52 sueros, 38 (73%) fueron IFI positivo, (20 con título 1/256, 14 con título 1/512, 3 con 1/1024, y 1 de 1/16000) (tabla 3.7.), 21 fueron ELISA (IgG&IgM) positivo (40%). En 16 (31%) coincidieron positivas ambas técnicas, y en 9 sueros (17%) IFI y ELISA fueron negativos (éstos correspondían a pacientes con resultados positivos en sueros anteriores o posteriores) (tabla 3.8.).

Catorce sueros (67%) de los 21 que se analizaron por ELISA individual fueron IgG positivo, 2 (9,5%) fueron IgM positivo, y 5 (24%) fueron IgG e IgM negativos (tabla 3.9.).

	Nº PACIENTES (%)				
	TITULO IFI				
	256	512	1024	2048	>2048
GRUPO I	78 (60)	30 (23)	18 (14)	4 (3)	0 (0)
GRUPO II	40 (67)	13 (22)	7 (12)	0 (0)	0 (0)
GRUPO III	20 (53)	14 (37)	3 (8)	0 (0)	1 (3)
TOTAL	138 (60,5)	57 (25)	28 (12)	4 (2)	1 (0,4)

Tabla 3.7.- Título de IFI en la totalidad de los sueros de los pacientes con sospecha de BL.

	IFI POSITIVO nº sueros (%)	ELISA (IgG&IgM) POSITIVO nº sueros (%)	TOTAL
Grupo I	130 (75%)	107 (62%)	173
EM	35 (74,5%)	30 (67%)	47
Grupo II	60 (70%)	47 (61%)	86
Grupo III	38 (73%)	21 (40%)	52
TOTAL	228 (73%)	175 (58,5%)	311

Tabla 3.8.- Resultados de IFI y ELISA (IgG&IgM) de los sueros de los pacientes con sospecha de BL.

	Nº PACIENTES		
	ELISA (IgG&IgM) POSITIVO	ELISA IgG POSITIVO Nº (%)	ELISA IgM POSITIVO Nº (%)
GRUPO I	102	67 (66%)	17 (17%)
GRUPO II	47	28 (60%)	5 (11%)
GRUPO III	21	14 (67%)	2 (9,5%)
TOTAL	170	109 (64%)	24 (14%)

Tabla 3.9.- Resultados de ELISA (IgG&IgM), IgG e IgM en la totalidad de los sueros de pacientes con sospecha de infección por Bb.



### 3.3.1.2.- Resultados de IFI y ELISA en el primer suero recibido de cada paciente.

Considerando el primer suero recibido de cada paciente, los resultados de las técnicas serológicas son las siguientes: de los 136 sueros, pertenecientes a los 136 pacientes con sospecha de infección por Bb, 105 (77%) tuvieron IFI positivo, 88 (67%) tuvieron ELISA (IgG&IgM) positivo (5 sueros no se analizaron por ELISA); el 54% de los sueros (71/131) fueron IFI y ELISA positivos, y el 8% (11/131) fueron IFI y ELISA negativos (tabla 3.10).

El porcentaje de pacientes del grupo I, en el que el primer suero recibido fue IFI positivo fue del 81% (52/64); ELISA (IgG&IgM) positivo tuvieron el 73% de los sueros (46/63); ELISA e IFI positivo tuvieron 41 sueros (65%), y ELISA e IFI negativo 6 sueros (9,5%) (tabla 3.10).

En el grupo de pacientes con criterios del CDC, aquellos que presentaron EM tuvieron los siguientes resultados en el 1º suero: el 82% (14/17) tuvieron IFI positiva, el 75% (12/16) tuvieron ELISA (IgG&IgM) positiva, el 75% (12/16) de ellos tuvieron tanto IFI como ELISA positivo, y el 19% (3/16) IFI y ELISA negativo (tabla 3.10).

Los pacientes pertenecientes al grupo II tuvieron los siguientes resultados en el primer suero: el 73% IFI positiva (35/48), el 66% ELISA (IgG&IgM) positiva (29/44), el 50% IFI y ELISA positivo, y el 9% IFI y ELISA negativo (tabla 3.10).

El 75% (18/24) de los pacientes falsos positivos (grupo III) tuvieron IFI positiva en su 1º suero, el 54% (13/24) tuvieron ELISA (IgG&IgM) positivo, el 33% (8/24) fueron IFI y ELISA positivo, y el 4% (1/24) IFI y ELISA negativo (tabla 3.10).

## PRIMER SUERO DE CADA PACIENTE

	IFI POSITIVO NO (%)	ELISA (IgG&IgM) POSITIVO NO (%)	TOTAL
Grupo I	52 (81%)	46 (73%)	64
EM	14 (82%)	12 (75%)	17
Grupo II	35 (73%)	29 (66%)	48
Grupo III	18 (75%)	13 (54%)	24
TOTAL	105 (77%)	88 (67%)	163

Tabla 3.10.- Resultados de IFI y ELISA (IgG&IgM) en el primer suero de los pacientes con sospecha de BL.

## 3.3.1.3.- Controles negativos

IFI: Se analizaron 50 sueros de donantes de sangre obtenidos en el Banco de Sangre del Hospital Ramón y Cajal. Todos ellos resultaron con títulos menores de 1/128 en el IFI. Correspondería a una especificidad del 100%.

ELISA: De 116 sueros de donantes de sangre, 3 (2,5%) fueron positivos por ELISA (IgG&IgM). Se trataría de una especificidad del 97,5%.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE IFI Y ELISA

Los valores de sensibilidad y especificidad de IFI y el ELISA están representados en la tabla 3.11.

TECNICA	INDIVIDUOS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
IFI	Grupo I		
	- 10 suero	81%	-
	- Total	75%	-
	Grupo II	-	30%
	Grupo III	-	27%
	Tuberculosis	NR	NR
	Donantes de sangre	-	100%
ELISA	Grupo I		
	- 10 suero	73%	-
	- Total	62%	-
	Grupo II	-	39%
	Grupo III	-	60%
	Tuberculosis	-	83%
	Donantes de sangre	-	97,5

Tabla 3.11.- Valores de sensibilidad y especificidad de IFI y ELISA en cada grupo de individuos (NR: no realizado).

### 3.3.1.4.- Cálculo del índice kappa.

Para estudiar el grado de concordancia entre las técnicas de IFI y ELISA se ha empleado el índice kappa (k). Los valores del índice k de cada uno de los grupos de pacientes, considerando la totalidad de los sueros, se muestran en la siguiente tabla 3.12.

	Indice kappa	(error estándar)
Grupo I	0,46	(0,07)
EM	0,72	(0,14)
Grupo II	0,2	(0,11)
Grupo III	0,04	(0,11)
TOTAL	0,31	(0,05)

Tabla 3.12.- Valores del índice kappa de IFI y ELISA para cada uno de los grupos de pacientes.

### 3.3.1.5.- Serología en LCR

Se analizaron por IFI 360 LCR de pacientes con sospecha de infección por Bb. Se hacían diluciones seriadas partiendo del LCR puro, y al igual que para los sueros, se incluían en cada ensayo dos controles positivos y uno negativo. Considerábamos la IFI positiva cuando a la dilución de 1/2 se mostraba una fluorescencia de 1+.

De los 360 LCR, 76 eran de pacientes con al menos una serología positiva en suero: cincuenta eran de 31 pacientes con criterios de BL, 10 de 9 pacientes sin criterios de BL y 16 de 8 pacientes con serología positiva falsa.

Hubo dos pacientes con EM que presentaban además manifestaciones neurológicas aceptadas como criterios del CDC (uno presentaba meningitis y polirradiculopatía y el otro parálisis facial bilateral y polirradiculopatía). Del primero se recogieron 2 LCR, cuyas IFI fueron positivas a las diluciones 1/32 y 1/4. Los 4 LCR recogidos del segundo paciente tuvieron los siguientes resultados: 1/64, 1/64, 1/16 Y 1/2.

De los 44 LCR de los 27 pacientes con manifestaciones neurológicas aceptadas como BL, dieciocho resultaron positivos y 26 negativos. Los LCR positivos correspondían a 11 de los 27 pacientes, de los cuales 7 presentaban meningitis linfocitaria. Además hubo cuatro pacientes con meningitis linfocitaria en cuyos LCR no se detectaron anticuerpos frente a la Bb.

Un paciente con ACA y otro con artritis presentaron manifestaciones neurológicas no aceptadas como BL. De ellos se obtuvieron tres LCR, resultando los tres negativos.

Se analizaron 10 LCR de 9 pacientes con manifestaciones neurológicas no aceptadas como criterio de BL. Cuatro de ellos fueron positivos por IFI.

Se obtuvieron 16 LCR de 8 pacientes positivos falsos con manifestaciones neurológicas. Trece de ellos resultaron IFI positiva y eran de cinco pacientes, tres de los cuales presentaron meningitis (uno diagnosticado de brucelosis, otro con VIH positivo y sífilis latente y el tercero con sífilis). Los otros dos presentaban una tuberculosis con afectación renal y un rhabdomyosarcoma embrionario primario.

### 3.3.2.- Inmunoblot

Se realizó el inmunoblot en los sueros de los pacientes con sospecha de infección por Bb recogidos entre Enero de 1990 y Junio de 1991, que habían resultado positivos por IFI y/o ELISA. También se realizó en 20 sueros de donantes de sangre obtenidos en el Banco de Sangre del Hospital Ramón y Cajal, y en 20 sueros de pacientes con serología negativa para Bb.

Se obtuvieron los siguientes sueros:

- 28 sueros de 17 pacientes con criterios de BL.
- 24 sueros de 16 pacientes sin criterios de BL.
- 13 sueros de 10 pacientes positivos falsos.

Las bandas resultantes del inmunoblot se leyeron en un densitómetro. En cada ensayo se utilizó un control positivo de un paciente con EM, y un pool de sueros de donantes de sangre como control negativo. La banda de 41 kDa del control positivo se consideraba con 100% de densidad en la lectura, y el resto de las bandas de los sueros se referían a este valor.

En el estudio del inmunoblot con la cepa B31, para cada suero se utilizaban dos tiras con las bandas proteínicas; en una se detectaban anticuerpos de tipo IgG y en la otra anticuerpos de tipo IgM, mediante la utilización de inmunoglobulinas antihumanas específicas de cada tipo, marcadas con fostatasa alcalina. Para la cepa Esp-1 se analizaron únicamente los anticuerpos de tipo IgG, debido a la baja proporción de individuos en cuyos sueros se detectaban anticuerpos de tipo IgM.

En la figura 3.3. se muestra el patrón proteínico de las dos cepas de Bb B31 y Esp-1.

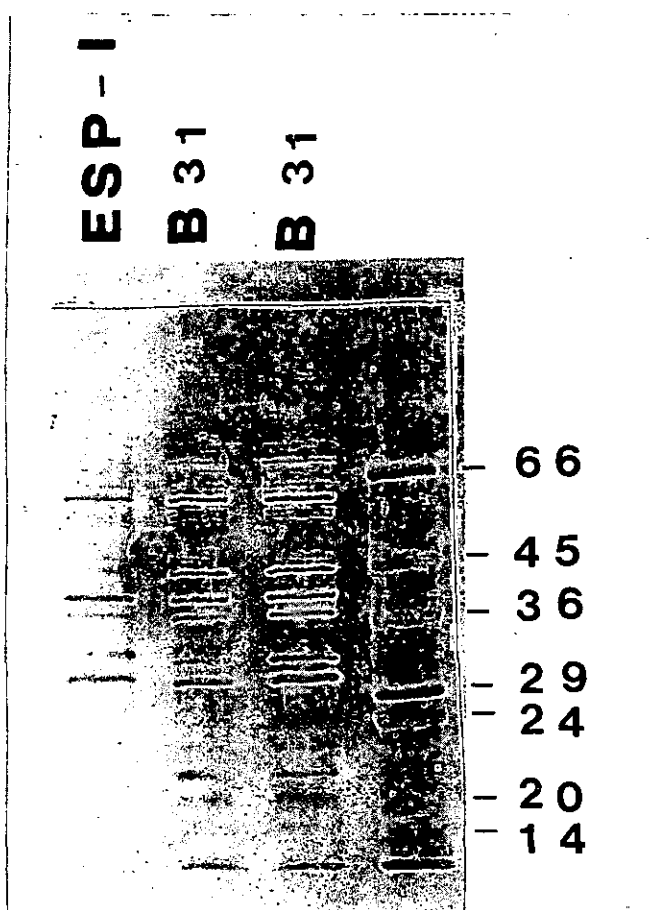


Figura 3.3.- Patrón proteínico de las cepas B31 y Esp-1 teñido con Coma-ssie. A la derecha, en kDa, figuran los pesos moleculares de los marcadores.

### 3.3.2.1.- Cepa B31

Una vez realizada la electroforesis en gel, y mediante la tinción con Comassie, el patrón proteínico de la cepa B31 mostró las bandas de aproximadamente los siguientes pesos moleculares: 72, 63, 60, 50, 45, 41, 38, 36, 34, 31, 21 y 19 kDa.

En la figura 3.4. se muestra el resultado del inmunoblot del control positivo, así como la gráfica obtenida de la lectura en el densitómetro.

Para analizar los resultados del inmunoblot se utilizó la regresión logística, y se realizaron dos estudios:

#### - ESTUDIO 1.-

Se clasificaron los individuos en:

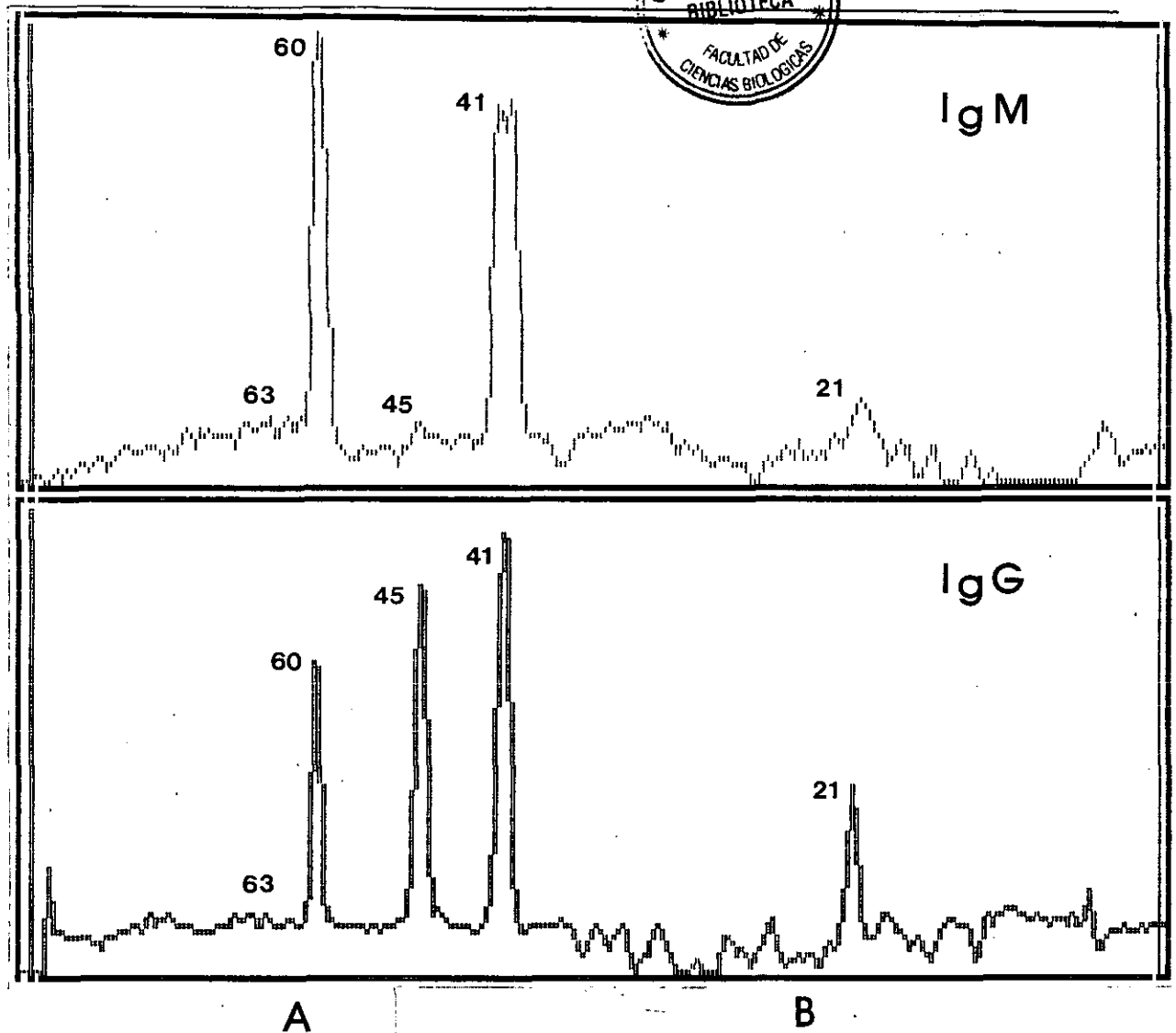
- Grupo A: donantes de sangre. Se realizó el inmunoblot en 20 sueros de donantes.

- Grupo B: pacientes con criterios de BL. Para la regresión logística se empleó el primer suero recibido de los 17 pacientes con criterios de BL obtenidos entre Enero de 1990 y Junio de 1991.

Para el análisis mediante regresión logística de las bandas del inmunoblot leídas en el densitómetro, se siguieron los siguientes pasos:

1.- Se hallaron las medias de los resultados de la lectura de cada banda en cada uno de los grupos. Se eliminaron las siguientes bandas, cuya media era 0 o próximo a 0: 72, 63, 45, 38, 36, 31 y 19 de tipo IgM, y 60, 45, 38, 36, 31 y 19 de tipo IgG.

2.- Se aplicó la regresión logística con las bandas restantes. Se fueron eliminando aquellas bandas cuyos valores de p eran los más elevados, hasta que se obtuvieron los siguientes resultados:



63	-	-	63
60	-	-	60
45	-	-	45
41	-	-	41
21	-	-	21

Figura 3.4.- Inmunoblot con la cepa B31 realizado con el suero utilizado como control positivo y su lectura en el densitómetro. Línea A: anticuerpos de tipo M (IgM); línea B: anticuerpos de tipo G (IgG). Se señalan los pesos moleculares en kDa. Se señalan los pesos moleculares en kDa.

	Coeficientes	p
Constante	-1,59564	0,01612
M60	13,32519	0,09312
G50	-16,21558	0,05858
G41	11,05719	0,00520
G34	20,81751	0,08215
M21	-21,83286	0,03163
log de la razón de verosimilitudes del modelo 25,69691 con p= 0,00013		

La fórmula de regresión logística obtenida fue por tanto la siguiente:

$$\ln (p/q) = -1,59564 + (13,32519 \times M60) + (-16,21558 \times G50) + (11,05719 \times G41) + (20,81751 \times G34) + (-21,83286 \times M22)$$

Cuando el valor de esta fórmula aplicada a un suero es positivo, éste pertenece a un paciente con mayor probabilidad de que pertenezca al grupo B que al grupo A. Si es negativo, la probabilidad de que no cumpla criterios de BL es mayor.

Aplicando esta fórmula en los sueros de los pacientes clasificados en los grupos A y B se obtienen los siguientes valores:

- Sensibilidad: 76,5% (13 pacientes de los 17 del grupo B estarían clasificados como pertenecientes a tal grupo).
- Especificidad: 90% (18 de los 20 donantes de sangre pertenecerían a tal grupo).

3.- Una vez calculada la fórmula de regresión logística, ésta se aplicó en cada uno de los sueros de los pacientes estudiados:

- Pacientes con criterios de BL: se recibieron a lo largo del tiempo 11 sueros más de los 17 pacientes, cuyo primer suero fue utilizado para la regresión. De los 11, 6 pertenecerían al grupo B. Correspondería a una sensibilidad del 55%.



- Pacientes sin criterios de BL: de los 24 sueros de los 16 pacientes sin criterios de BL, 11 pertenecerían al grupo de donantes y 13 al grupo de pacientes con criterios de BL. Se trataría de una especificidad del 46%.

- Pacientes con serología positiva falsa: De los 13 sueros de los 10 pacientes positivos falsos, 8 fueron clasificados como donantes de sangre, y 5 como pacientes con BL. La especificidad en este grupo de pacientes sería del 62%.

- Pacientes con serología negativa para Bb: de los 20 sueros pertenecientes a estos pacientes, 11 pertenecerían al grupo A y 9 al B. Correspondería por lo tanto a una especificidad del 55%.

- Donantes de sangre: 18 de los 20 donantes de sangre pertenecerían a tal grupo. La especificidad sería del 90%.

- Pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo: de los 47 pacientes estudiados, 42 fueron pertenecerían al grupo A, y 5 al grupo de pacientes con criterios de BL. En este grupo la especificidad sería del 89%.

## - ESTUDIO 2.-

La clasificación de los pacientes fue la siguiente:

- Grupo A: Pacientes sin BL. Agrupamos aquí los pacientes con serología negativa para Bb (20 sueros) y los pacientes con serología positiva falsa (se tomó el primer suero de los 10 pacientes positivos falsos).

- Grupo B: Pacientes con criterios de BL (17 sueros).

Los pasos seguidos para la obtención de la fórmula de la regresión logística fueron los mismos empleados en el estudio anterior:

1.- Se eliminaron las siguientes bandas por tener una media en los dos grupos de 0 o próximo a 0: 72, 63, 60, 50, 45, 38, 36, 34, 31 y 19 del tipo IgM, y 45, 36, 31 y 19 del tipo IgG.

2.- Eliminando las bandas cuya p era la más elevada, se llegaron a los siguientes resultados:

	Coeficientes	p
Constante	-2,07829	0.00211
G67	-10,18462	0.06198
G63	7,29118	0.07991
G60	18,72080	0.18084
M41	4,14442	0.18817
G38	8,02014	0.09004
G34	11,74381	0.01497
M21	12,43657	0.03370
G21	-8,59503	0.09148

log de la razón de verosimilitudes del modelo 27,39949  
con p= 0,00066

La fórmula de regresión logística en este caso es la siguiente:

$$\ln(p/q) = -2,07829 + (-10,18462 \times G67) + (18,72080 \times G60) + (4,14442 \times M41) + (8,02014 \times G38) + (11,74381 \times G34) + (12,43657 \times M21) + (-8,59503 \times G21)$$

Aplicando la fórmula de regresión obtenida con estos coeficientes en los grupos A y B se obtienen los siguientes valores:

- **Sensibilidad:** 76,5% (13 de los 17 pacientes con criterios de BL estarían bien clasificados).

- **Especificidad:** 93,3% (28 de los pacientes sin infección por Bb estarían clasificados como donantes de sangre).

3.- Continuando con la aplicación de la fórmula en todos los sueros obtenidos, los resultados son los que vienen a continuación:

- Pacientes con criterios de BL: de los 11 sueros recibidos de los 17 pacientes de este grupo, 4 clasificarían correctamente a los pacientes. La sensibilidad sería del 36%.

- Pacientes sin criterios de BL: de los 24 sueros, 12 clasificarían a los pacientes como pertenecientes al grupo A. Correspondería por lo tanto a una especificidad del 50%.

- Pacientes con serología positiva falsa: de los 13 sueros de los 10 pacientes, 11 los descartarían de ser pacientes con criterios de BL. Sería una especificidad del 85%.

- Pacientes con serología negativa para Bb: de los 20 sueros, 19 clasificarían a los pacientes como pacientes sin BL. Hablaríamos de una especificidad del 95%.

- Donantes de sangre: De los 20 donantes, 16 estarían clasificados como grupo A. Se trataría de una especificidad del 80%.

- Pacientes con tuberculosis: 43 de los 47 pacientes con tuberculosis pertenecerían al grupo de pacientes sin BL. Por lo tanto la especificidad sería del 91,5%.

En la tabla 3.13 están detallados los datos de sensibilidad y especificidad del inmunoblot con la cepa B31 en los distintos grupos de pacientes y de acuerdo con los estudio 1 y 2.

INDIVIDUOS	SENSIBILIDAD		ESPECIFICIDAD	
	Estudio 1	Estudio 2	Estudio 1	Estudio 2
Grupo I				
10 suero	76,5%	76,5%	-	-
Siguiente	55%	36%	-	-
Totalidad	68%	61%	-	-
Grupo II	-	-	46%	50%
Grupo III	-	-	62%	85%
Tuberculosis	-	-	89%	91,5%
Serología negativa	-	-	55%	95%
Donantes de sangre	-	-	90%	80%

Tabla 3.13.- Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en el inmunoblot con la cepa B31.

En la figura 3.5. se muestran algunos de los resultados del inmunoblot con la cepa B31 de pacientes con sospecha de BL y en la figura 3.6. los resultados del inmunoblot de algunos donantes de sangre y pacientes con serología por IFI y ELISA negativo.

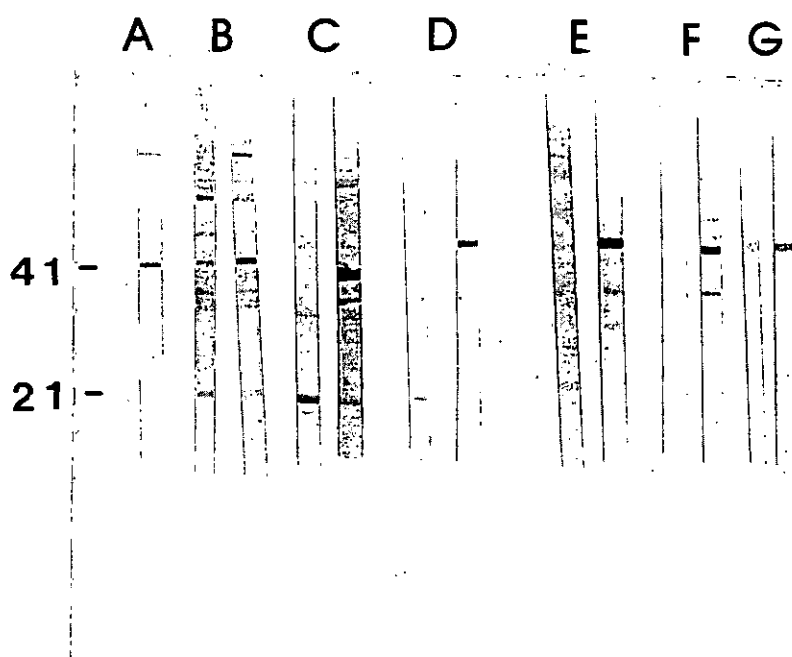


Figura 3.5.- Inmunoblot IgM e IgG realizado con sueros de pacientes con sospecha de BL. A la izquierda, en kDa, figuran algunos de los pesos moleculares. Línea A: paciente con EM; línea B: polirradiculopatía; línea C: meningoencefalitis y máculas puntiformes; línea D: artritis; línea E: morfea; línea F: poliartralgias y fiebre; línea G: tuberculosis.

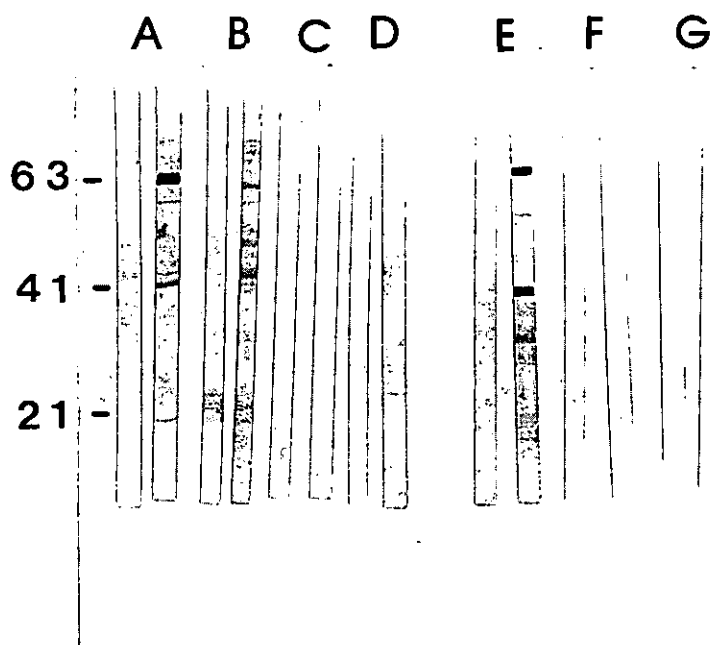


Figura 3.6.- Inmunoblot IgM e IgG de donantes y de pacientes con serología por IFI y ELISA negativa. En la izquierda, en kDa, figuran algunos de los pesos moleculares. Líneas A,B,C y D: donantes; líneas E,F y G: pacientes con IFI y ELISA negativas.

### 3.3.2.2.- Cepa Esp-1

El patrón proteínico de la cepa española de Bb Esp-1 mostró las bandas de aproximadamente los siguientes pesos moleculares: 72, 63, 60, 50, 45, 41, 38, 36, 34, 31, 21 y 19 Kda.

En la figura 3.7. se muestra el inmunoblot con la cepa Esp-1 del control positivo, así como la gráfica resultante de la lectura en el densitómetro.

Debido a la baja proporción de pacientes con anticuerpos de tipo IgM frente a la cepa B31, el inmunoblot con la cepa Esp-1 se realizó únicamente para detectar anticuerpos de tipo IgG.

Se analizaron los siguientes sueros:

- 20 sueros de 13 pacientes con criterios de BL.
- 14 sueros de 10 pacientes sin criterios de BL.
- 6 sueros de 5 pacientes positivos falsos.

Además se analizaron 20 sueros de donantes de sangre y 20 de pacientes con serología negativa por IFI y ELISA.

Para la valoración de los resultados del inmunoblot se calculó la fórmula de regresión logística como en el caso de la cepa B31. Se realizaron dos estudios.

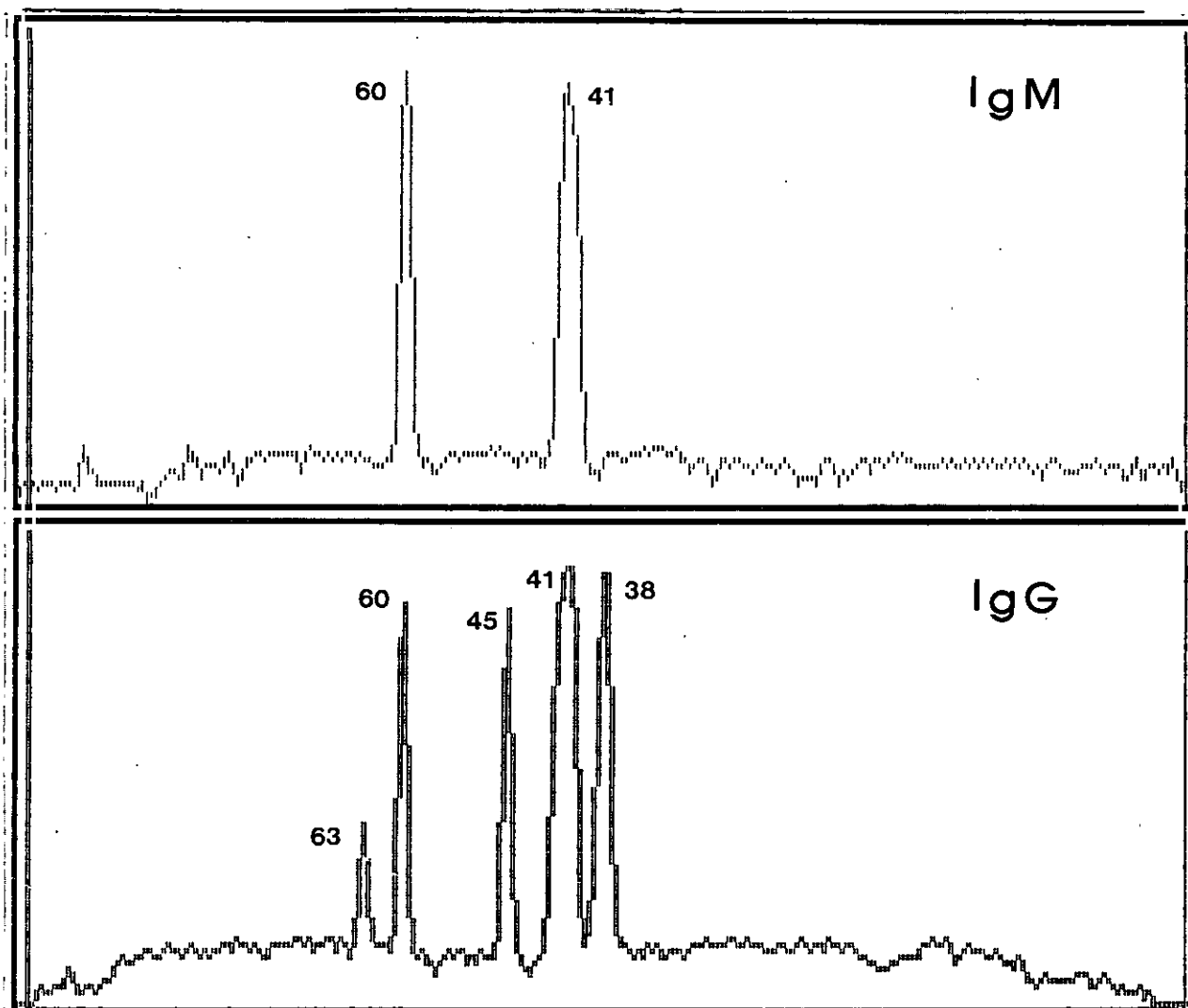
#### - ESTUDIO 1.-

Se clasificaron los pacientes en dos grupos:

- Grupo A: donantes de sangre (20 sueros), y
- Grupo B: pacientes con criterios de BL. Se utilizó el primer suero recogido de los 13 pacientes con criterios de BL.

Se siguieron los siguientes pasos:

1.- Se eliminaron las bandas de 34 y 20 kDa por tener medias en los dos grupo de 0 o próximas. Su valor discriminatorio sería nulo.



A

B

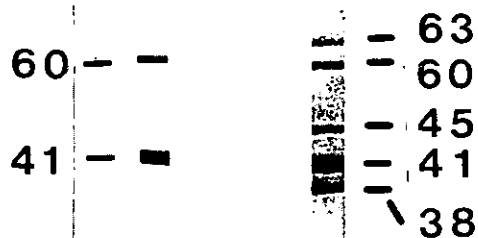


Figura 3.7.- Inmunoblot con la cepa Esp-1 del suero utilizado como control positivo y su lectura en el densitómetro. Línea A: anticuerpos de tipo M (IgM); línea B: anticuerpos de tipo G (IgG). Se señalan los pesos moleculares en kDa.

2.- Para llegar al mejor modelo se siguió la estrategia hacia adelante, que consiste en hacer la regresión logística con cada banda individualmente, escoger aquella cuya p sea la menor e ir añadiendo de una en una las siguientes con p más baja. Así se llegó a los siguientes resultados:

	Coeficientes	p
Constante	-2,06023	0,00438
G60	79,74036	0,22557
G45	-1,74881	0,65613
G41	0,69297	0,21146
G31	9,96331	0,25764
log de la razón de verosimilitudes del modelo 21,00470 con p=0,00038		

La fórmula de regresión logística es la siguiente:

$$\ln(p/q) = -2,06023 + (79,74036 \times G60) + (-1,74881 \times G45) + (0,69297 \times G41) + (9,96331 \times G31)$$

Con estos coeficientes y aplicando la fórmula obtenida en los grupos A y B, se obtuvieron los siguientes valores de sensibilidad y especificidad:

- **Sensibilidad:** 69% (9 de los 13 pacientes con criterios de BL fueron clasificados correctamente).

- **Especificidad:** 100% (todos los donantes de sangre fueron clasificados como tales).

- 3.- Se aplicó la fórmula de regresión logística a todos los grupos de pacientes estudiados. Los resultados son los siguiente:

- Pacientes con criterios de BL: se recibieron 7 sueros más de los 13 pacientes de este grupo. De ellos, 5 los clasificarían correctamente. Correspondería a una sensibilidad del 71%.

- Pacientes sin criterios de BL: se recibieron 14 sueros de estos pacientes. Siete de ellos clasificarían a los pacientes como donantes de sangre. Sería una especificidad del 50%.

- Pacientes con serología positiva falsa: se recibieron un total de 6 sueros de estos pacientes. Sólo 2 de ellos estarían clasificados como donantes de sangre. Sería una especificidad del 33%.

- Donantes de sangre: de los 20 donantes, todos ellos estarían correctamente clasificados. La especificidad sería del 100%.

- Pacientes con serología negativa por IFI y ELISA: de los 20 sueros, sólo 1 estaría mal clasificado. Correspondería a una especificidad del 95%.

- Pacientes con tuberculosis: de los 47 pacientes, todos salvo 3 estaría bien clasificados. Sería una especificidad del 94%.

#### - ESTUDIO 2.-

La clasificación de los pacientes fue como sigue:

- Grupo A: pacientes sin BL. A este grupo pertenecerían los 20 pacientes con serología negativa por IFI y ELISA, y 5 pacientes con otra etiología que pudiera justificar los síntomas (positivos falsos).

- Grupo B: pacientes con criterios de BL (13 primeros sueros recibidos de los 13 pacientes con criterios de BL).

Se siguieron los pasos como en el estudio 1, eliminando el primer paso, pues ninguna banda tuvo como media 0 ó próximo.

1.- Siguiendo la estrategia hacia adelante, se llegó a los siguientes valores de los coeficientes:

	Coeficientes	p
Constante	1,68662	0,00175
G72	-0,24597	0,77412
G45	3,21062	0,51441
G41	1,24579	0,04674
log de la razón de verosimilitudes del modelo 15,66127 con p= 0,00148		



La fórmula de regresión logística en este caso es:

$$\ln (p/q) = 1,68662 + (-0,24597 \times G72) + (3,21062 \times G45) + (1,24579 \times G41)$$

Aplicando esta fórmula a cada uno de los grupos, se obtuvieron los valores:

- **Sensibilidad:** 62% (8 de los 13 sueros estarían clasificados como pacientes con criterios de infección por Bb).
- **Especificidad:** 92% (23 de los 25 sueros clasificarían a los pacientes como pacientes sin BL).

2.- Aplicando la fórmula de regresión logística a los pacientes estudiados, se obtienen los siguientes resultados:

- Pacientes con criterios de BL: de los 7 sueros recogidos al cabo del tiempo de los 13 pacientes, 5 estarían bien clasificados (sensibilidad del 71%).
- Pacientes sin criterios de BL: 4 de los 14 sueros clasificaría correctamente al paciente (especificidad del 29%).
- Pacientes con serología positiva falsa: de los 6 sueros de los 5 pacientes, sólo 1 clasificaría incorrectamente al paciente (especificidad del 83%).
- Donantes de sangre: de los 20 sueros, 17 estarían bien clasificados (especificidad del 85%).
- Pacientes con serología negativa: de los 20 sueros, 18 estarían bien clasificados (especificidad del 90%).
- Pacientes con tuberculosis: 8 de los 47 pacientes estarían clasificados como pacientes con criterios del CDC (especificidad del 83%).

En la tabla 3.14 están detallados los resultados de sensibilidad y especificidad del inmunoblot con la cepa Esp-1, en los distintos grupos de pacientes, y mediante los estudios 1 y 2.

INDIVIDUOS	SENSIBILIDAD		ESPECIFICIDAD	
	Estudio 1	Estudio 2	Estudio 1	Estudio 2
Grupo I				
10 suero	69%	62%	-	-
Siguiente	71%	71%	-	-
Totalidad	70%	65%	-	-
Grupo II	-	-	50%	29%
Grupo III	-	-	33%	83%
Serología negativa	-	-	95%	90%
Tuberculosis	-	-	94%	83%
Donantes de sangre	-	-	100%	85%

Tabla 3.14.- Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en el inmunoblot con la cepa Esp-1.

En la figura 3.8. se muestra algunos de los resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de pacientes con criterios de BL, donantes de sangre.

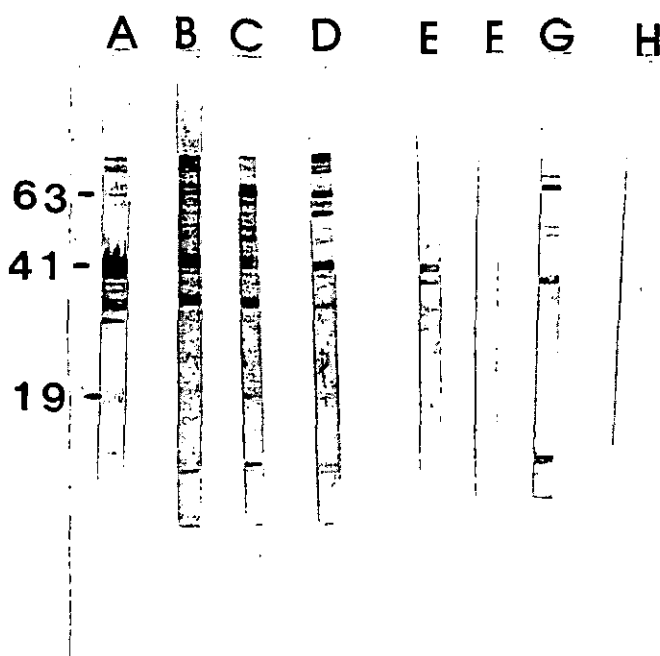


Figura 3.8.- Inmunoblot con la cepa Esp-1 de los sueros siguientes: línea A: paciente con EM, meningitis y polirradiculopatía; línea B: polineuropatía y lesión eritematosa; línea C: poliartralgias y fiebre; línea D: síndrome paraneoplásico de pulmón; línea E y F: donantes; línea G y H: pacientes con IFI y ELISA negativos. A la izquierda se señalan algunos de los pesos moleculares.

En las tabla 3.15. a 3.17 del anexo se detallan los resultados de IFI, ELISA, serología en el LCR y manifestaciones clínicas de los pacientes con criterios de BL, sin criterios de BL y positivos falsos.

En las tablas 3.18. a 3.23. se detallan los resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes con criterios de BL, sin criterios, de los pacientes positivos falsos, donantes de sangre, de los pacientes con IFI y ELISA negativos y de los pacientes con tuberculosis.

En las tabla 3.24. a 3.29. se señalan los datos del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los mismos grupos de pacientes que los detallados con la cepa B31.

## PACIENTES CON CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

Nº	Nº	IFI	ELISA			SEROLOGIA LCR		MANIFESTACIONES CLINICAS
			gAM	IgG	IgM	LCR	TITULO	
1	10	128	NR	NR	NR	471	32	EM, Artritis, Polineuropatía Mialgias, astenia, náuseas, vómitos
	11	128	NR	NR	NR	917	4	
	14	128	0.88	NR	NR			
2	159	256	>1	>1	<1	NR	NR	EM Fiebre, artromialgias
	201	256	>1	>1	<1			
3	407	64	0.35	NR	NR	-	-	ECM Síndrome gripal, fiebre, astenia
	422	2048	1.14	<1	>1			
	514	512	>1	<1	>1			
	605	64	<1	NR	NR			
	828	64	<1	NR	NR			
	386	64	<1	NR	NR			
	880	128	0.79	NR	NR			
4	472	256	>1	>1	<1	-	-	EM, artritis
	505	512	>1	>1	<1			
	523	512	0.83	<1	<1			
	545	512	>1	<1	<1			
5	625	256	0.85	<1	<1	-	-	EM, meningitis, polirradiculopatía
	646	256	0.77	<1	<1			
6	688	512	>1	>1	<1	-	-	EM
	875	256	>1	>1	<1			
7	870	2048	>1	>1	>1	-	-	EM, meningitis, polirradiculopatía
	916	1024	>1	>1	>1			
	055	256	1.1	<1	<1			
	151	256	1.2	0.94	0.52			
8	752	<64	<1	NR	NR	-	-	EM
9	699	<64	0.35	<1	<1	-	-	EM
97	207	256	1.01	1	NR	-	-	EM. Polineuropatía
	248	256	0.85	0.88	0.1			
	315	256	0.83	1.14	0.08			
	613	128	0.89	0.74	0.1			
98	198	1024	1.35	1.10	0.08	-	-	EM
	226	512	2.20	1.32	0.08			
	332	256	2.40	1.80	0.18			
	470	256	1.80	1.31	0.15			
106	271	256	1.40	1.30	<1	-	-	EM
	301	256	1.80	1.30	0.03			
132	570	256	1.08	2.03	0.20	-	-	EM
133	608	1024	2.68	2.47	0.69	-	-	EM, Parálisis facial Artralgias, astenia
138	678	256	1.07	0.57	0.13	-	-	EM, Artritis Fiebre
	679	256	1.17	0.70	0.38			
	680	256	1.60	0.99	0.34			
154	27	256	1.07	1.02	0.45	28	64	EM, Parálisis facial bilateral Polirradiculopatía
	36	256	1.30	NR	NR	37	64	
	41	256	1.13	NR	NR	42	16	
	83	<64	0.81	NR	NR	82	2	
165	20	256	1.10	1.07	0.40	NR	NR	EM
	107	256	1.32	1.01	NR			
10	03	128	<1	<1	<1	-	-	Artritis, Parálisis facial bilateral Bloqueo atrio-ventricular
	55	128	<1	<1	<1			
	99	256	0.47	<1	<1			
	136	512	0.53	<1	<1			
	137	512	0.59	<1	<1			
13	109	512	>1	NR	NR	-	-	Artritis, Parálisis facial
	111	256	>1	>1	<1			
18	530	1024	1.06	<1	<1	-	-	Artritis, Mononeuritis múltiple
	584	256	>1	<1	<1			

Tabla 3.15.- Resultados de la serología en suero y en LCR, y manifestaciones clínicas de los pacientes con criterios de BL.

(continuación)

## PACIENTES CON CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

Nº PACIENTE	Nº SUERO	IFI	ELISA			SEROLOGIA LCR		MANIFESTACIONES CLINICAS
			GM	IG	IGM	LCR	TITULO	
19	589	512	1.10	NR	NR	602	<1	Acrodermatitis crónica atrófica Artritis. Pérdida de fuerza en cinturas escapular y pelviana
	628	512	0.85	NR	NR	827	<1	
	750	256	0.85	NR	NR			
	826	256	0.83	NR	NR			
	852	64	0.84	NR	NR			
	885	256	1.80	1.10	<1			
	284	256	1.70	0.98	0.00			
	370	128	8.82	NR	NR			
	488	256	1.10	NR	NR			
	527	128	0.59	NR	NR			
	693	256	1.14	1.07	0.03			
	734	256	1.10	1.32	0.03			
	819	128	0.89	0.83	0.07			
	132	64	0.70	NR	NR			
20	243	128	0.92	NR	NR			Artritis, Polineuropatía Erupción cutánea generalizada, fiebre, artromialgias
	006	128	0.88	NR	NR			
22	651	2048	>1	>1	<1	694	2	Artritis, Parálisis facial Fiebre
	22	2048	1.06	1.40	1.45			
	100	256	1.07	1.10	0.30			
24	345	256	1.19	0.84	0.40			Artritis, polirradiculopatía
	47	256	0.62	0.5	0.12	112	<1	
11	11	128	<1	NR	NR			Artritis Eritema, parálisis MSI, amiotrofias febrícula
	43	256	<1	<1	<1	42	<1	
	45	256	0.43	<1	<1			
	47	512	0.73	<1	<1			
	56	256	1.76	<1	<1			
	70	256	1.05	<1	<1			
12	90	512	0.67	<1	<1			Meningitis Taquibradicardia, fiebre
	80	256	>1	<1	>1	82	<1	
	127	256	>1	<1	>1			
14	146	256	>1	>1	<1			Meningitis Lesiones cutáneas, déficit sensitivo- motor
	270	256	>1	>1	<1	271	<1	
	284	256	>1	>1	<1	286	2	
	313	512	>1	>1	<1	314	<1	
15	431	512	>1	>1	<1	432	<1	Artritis, lesiones papulo-eritematosas, liquen esclerótico atrófico
	276	256	>1	<1	>1	NR	NR	
17	360	1024	>1	>1	<1	361	>16	Parálisis facial, meningitis Polirradiculopatía Poliartralgias
	418	1024	>1	>1	<1	419	1	
	616	1024	>1	>1	<1	711	2	
	710	1024	>1	>1	<1			
21	756	1024	0.67	<1	<1	NR	NR	Artritis, Uveítis Urticaria, mialgia, astenia
	772	1024	<1	<1	<1			
	833	1024	0.81	<1	<1			
22	96	1024	>1	>1	<1	97	32	Meningitis
	112	1024	>1	>1	<1	113	16	
	144	1024	>1	>1	<1			
23	142	512	0.59	<1	<1	143	8	Meningitis, Parálisis facial Polirradiculopatía Artromialgias
	151	128	NR	NR	NR	152	2	
						155	2	
						182	<1	
27	272	256	0.05	<1	<1	NR	NR	Meningitis, Radiculopatía
29	338	512	0.69	NR	NR	340	<1	Meningitis Fiebre
	303	512	0.80	<1	<1			
30	354	256	>1	>1	<1	412	<1	Polirradiculoneuropatía
	411	256	>1	>1	<1			
31	362	1024	0.33	<1	<1	NR	NR	Meningitis Fiebre, poliartalgias
32	388	256	>1	>1	<1	435	2	Polirradiculoneuropatía
	434	256	>1	>1	>1			
	461	256	>1	>1	>1			

Tabla 3.15.- Resultados de la serología en suero y en LCR, y manifestaciones clínicas de los pacientes con criterios de BL.

(continuación)

## PACIENTES CON CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

Nº PACIENTE	Nº SUERO	IFI	ELISA			SEROLOGIA LCR		MANIFESTACIONES CLÍNICAS
			GRM	IGG	IGM	LCR	TITULO	
33	426	1024	1.10	<1	<1	NR	NR	Bloqueo atrioventricular. Cefalea
	453	256	0.59	<1	<1			
	577	64	0.9	NR	NR			
	934	0	0.71	NR	NR			
	388	128	0.68	NR	NR			
	105	128	1.11	1.01	NR			
37	663	512	>1	>1	<1	NR	NR	Radiculopatía
	708	256	>1	>1	<1			
38	664	256	0.4	<1	<1	675	<1	Mononeuritis múltiple
	680	256	0.42	<1	<1	577	<1	
	568	64	<1	NR	NR			
40	603	512	>1	>1	<1	692	2	Meningitis. Lumbalgias
	693	512	1.04	0.71	<1			
	825	256	1.10	<1	<1			
	282	256	1.2	1.90	0.3			
	292	256	2.7	1.12	0.36			
42	737	512	>1	>1	<1	745	<1	Polirradiculoneuropatía. Pérdida peso
	758	1024	>1	>1	<1			
	807	256	>1	>1	<1			
43	790	512	>1	>1	<1	NR	NR	Artritis
	709	256	>1	>1	<1			
44	837	512	>1	<1	<1	838	>64	Meningitis, Polirradiculopatía
	839	1024	>1	<1	<1	840	>64	
45	860	256	0.33	<1	<1	861	<1	Polineuropatía.
	81	512	0.907	1.15	0.18			
48	935	256	>1	>1	<1	936	<1	Meningoencefalitis. Artralgias
	937	256	>1	>1	<1			
	50	256	>1	>1	<1			
50	672	128	>1	<1	<1	NR	NR	Polineuropatía
52	701	128	>1	<1	<1	703	<1	Meningitis
	716	128	>1	<1	<1			
	797	0	<1	NR	NR			
83	23	256	>1	0.65	1.66	NR	NR	Artritis
87	110	64	1.03	0.22	0.46	"	"	Polineuropatía
103	140	256	1.63	1.5	0.43	NR	NR	Mononeuritis múltiple
104	152	128	1.08	0.16	0.72	"	"	ACA, Polineuropatía Cefalea
	179	64	1.2	0.57	0.3			
	255	128	<1	NR	NR			
107	219	64	1.04	0.57	1.05	220	2	Meningoencefalitis. Máculas puntiformes
	253	64	0.92	NR	NR	254	<1	
108	288	256	1.17	0.5	0.4	289	<1	Polirradiculopatía
124	454	64	0.85	0.79	0.1	492	<1	Polineuropatía. Lesión eritematosa
	461	256	1.10	0.85	0.45			
125	360	256	1.2	0.69	0.33	NR	NR	Parálisis facial
130	547	256	0.62	NR	NR	548	<1	Neuritis craneal, afectación trigémino
140	609	256	1.50	1.58	0.37	662	<1	Meningitis, Polineuropatía
	698	256	1.20	1.59	0.41			
	733	128	0.9	NR	NR			
	104	128	0.71	NR	NR			
	211	128	0.61	NR	NR			
141	710	512	1.86	1.89	0.37	NR	NR	Artritis
150	489	256	1.02	1.26	0.16	490	<1	Parálisis facial de repetición
153	766	256	1.22	0.66	2.3	NR	NR	Polirradiculopatía

Tabla 3.15.- Resultados de la serología en suero y en LCR, y manifestaciones clínicas de los pacientes con criterios de BL.

(continuación)

## PACIENTES CON CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

Nº	Nº	IFI	ELISA			SEROLOGÍA LCR		MANIFESTACIONES CLÍNICAS
			GAM	I <sub>GG</sub>	I <sub>GM</sub>	LCR	TÍTULO	
PACIENTE	SUERO							
157	232	512	1.2	1.2	0.14	240	<1	Neuritis craneal, parálisis facial
160	205	512	1	1.19	0.06	NR	NR	Linfocitoma. Poliartralgias
16	277	128	<1	<1	<1	-	-	Artritis. Queratodermia
	309	512	>1	<1	>1			
	456	512	>1	>1	>1			
	684	256	>1	<1	>1			
	868	256	>1	<1	>1			

Tabla 3.15.- Resultados de la serología en suero y en LCR, y manifestaciones clínicas de los pacientes con criterios de borreliosis de Lyme.

## PACIENTES SIN CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

Nº	Nº	IFI	ELISA			SEROLOGÍA LCR		MANIFESTACIONES CLÍNICAS
			GAM	I <sub>GG</sub>	I <sub>GM</sub>	LCR	TÍTULO	
PACIENTE	SUERO							
26	219	256	>1	>1	<1	220	<1	Enfermedad desmielinizante, mielopatía, amiotrofia, paraparesia espástica, lumbalgia
	233	512	>1	>1	<1			
	498	128	<1	NR	NR			
28	295	128	NR	NR	NR	NR	NR	Erupción eritematopapulosa descamativa circinada. Fiebre
	333	256	NR	<1	<1			
	468	256	NR	<1	<1			
35	525	256	<1	<1	<1	-	-	Morfea
36	657	512	<1	<1	<1	-	-	Morfea
	820	128	0.89	<1	<1			
39	671	256	<1	<1	<1	760	2	Desmielinización, atrofia muscular
	759	256	<1	<1	<1	914	<1	Artralgias
41	661	128	<1	NR	NR	NR	NR	Ecleriosis múltiple
	690	256	<1	<1	<1			
46	493	256	<1	NR	NR	-	-	Pericarditis con derrame pericárdico
	932	64	<1	NR	NR			Artralgias
51	679	64	>1	<1	>1	-	-	Morfea
60	254	128	NR	NR	NR	-	-	Poliartralgias, fiebre
	293	512	NR	NR	NR			
	414	256	NR	NR	NR			
	507	64	<1	NR	NR			
	595	64	<1	NR	NR			
	846	64	<1	NR	NR			
	259	256	1.6	NR	NR			
	298	256	1.25	1.3	0.12			
	452	128	1.49	0.76	0.02			
	512	64	1.2	1.04	0.15			
	660	0	0.36	1.23	0.10			
66	555	256	<1	<1	<1	556	<1	
76	436	256	NR	<1	<1	NR	NR	Fiebre, cefalea
	499	256	NR	<1	<1			
77	476	512	NR	>1	<1	-	-	Morfea
	596	256	<1	<1	<1			
78	732	256	>1	<1	<1	-	-	Poliartralgias
85	77	512	1.24	1.46	0.62	78	2	Hipertensión intracraneal
86	68	512	1.10	0.68	1.79	69	<1	Ecleriosis múltiple. Artralgias
	97	512	1.01	0.67	1.90			
88	169	256	1.50	2.38	0.92	NR	NR	Erupción eritematosa, parestia

Tabla 3.16.- Resultados de la serología en suero y LCR y manifestaciones clínicas de los pacientes sin criterios de BL.

(continuación)

## PACIENTES SIN CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

Nº PACIENTE	Nº SUERO	IFI	ELISA			SEROLOGIA LCR		MANIFESTACIONES CLÍNICAS
			GM	IgG	IgM	LCR	TITULO	
89	212	64	1.02	0.73	0.64	-	-	Esclerosis múltiple
91	181 229	64 256	0.62 0.74	0.53 NR	0.36 NR	-	-	Convulsiones, encefalitis
94	317 444	256 1024	0.70 1	0.73 0.76	0.24 0.83	-	-	Meningitis purulenta con cultivo negativo. Mielopatía
95	307 356	1024 1024	0.83 2.04	0.82 1.50	0.16 0.21	-	-	Eritema con centro necrótico, hipoestesia facial, palpitaciones, lumbalgia, fiebre
96	138	128	1.09	0.19	0.66	-	-	Morfea
101	200 269	256 256	0.82 0.92	0.80 0.90	0.12 0.13	-	-	Exantema evanescente en guirnalda, fiebre, hidrocefalia, artronalgias, cefalea
109	224 282	64 128	1.50 0.61	1.70 0.83	0.19 0.11	NR	NR	Máculas pustulosas diseminadas, febrícula
111	313 405	256 256	1.50 1.70	1.40 1.20	0.10 0.09	-	-	Desmielinización, ictus
115	141	256	1.76	1.63	0.91	142	<1	Cefalea, anemia, aumento VSG
116	450 723	64 1024	0.96 1.80	0.91 1.52	0.77 1.13	NR	NR	Esclerosis múltiple
118	442 724	512 256	2.80 2.20	0.99 1.10	0.30 0.05	474	<1	Pérdida de memoria, demencia
121	479 494	128 128	0.85 1.19	0.85 0.98	0.68 1.20	477	<1	Esclerosis múltiple
129	524	256	1.17	1.55	0.05	NR	NR	Paraparesia espástica
131	551	256	0.29	NR	NR	-	-	Nódulos cutáneos
135	630	256	0.40	NR	NR	-	-	Morfea
143	738 740 23	512 512 512	2.40 2.30 1.80	2.10 1.50 1.71	0.39 0.46 0.60	739	2	Demencia subaguda
144	753 60	256 256	1.31 1.62	1.17 0.66	0.16 0.28	NR	NR	Fiebre, lesiones cutáneas inespecíficas
145	493	256	1.24	0.60	0.52	-	-	Clínica abigarrada inespecífica
146	562	256	1	2	0.04	-	-	Cervicalgias, lesión intramedular
147	574	256	1.13	1.71	0.30	-	-	Esclerosis múltiple
148	583	64	1	1.40	0.11	-	-	Pérdida de memoria, demencia
151	636	64	1.12	0.68	0.36	-	-	Papulomáculas eritematosas
152	663	256	1.20	0.79	0.07	-	-	Paraparesia espástica hereditaria
155	487	256	2.35	1.06	0.01	-	-	Poliartralgias
158	126 127 128	128 128 64	1.10 1.20 0.70	0.79 0.98 NR	0.40 0.30 NR	-	-	Artralgias, febrícula, astenia
159	217	256	1.10	1.30	0.30	-	-	Artralgias
161	215	256	1.07	1.05	0.12	-	-	Artralgias
162	214	512	1.10	1.60	0.06	-	-	Artralgias
163	213	512	1.18	1.80	0.30	-	-	
164	49	256	1.26	0.79	1.07	-	-	Esclerosis múltiple
67	655 668 777	1024 1024 1024	>1 >1 >1	<1 <1 <1	>1 <1 <1	-	-	Exantema maculopapuloso generalizado
79	794 823	256 256	<1 <1	<1 <1	<1 <1	-	-	Eritemas múltiples violáceos, poliartralgias

Tabla 3.16.- Resultados de la serología en suero y en LCR, y manifestaciones clínicas de los pacientes sin criterios de BL.



## PACIENTES CON SEROLOGIA POSITIVA FALSA

NO	NO	IFI	ELISA			SEROLOGIA LCR		DIAGNOSTICO FINAL
			GM	IgG	IgM	LCR	TITULO	
47	928	512	<1	NR	NR	929	>64	Brucelosis. (Polineuropatía motora, Meningitis linfocitaria, Poliartralgias, fiebre, cefalea, artromialgias)
	87	256	0.81	<1	<1	88	64	
	108	256	0.9	0.84	0.21	109	>2	
	195	256	<1	NR	NR	196	>16	
	502	64	0.77	NR	NR	556	128	
	529	128	0.3	NR	NR			
56	91	128	0.33	NR	NR			Sífilis. (Meningitis linfocitaria crónica)
	129	128	<1	NR	NR	14	72	
	165	256	<1	<1	<1	25	92	
	230	256	<1	<1	<1	50	12	
	258	256	<1	<1	<1			
	502	256	<1	<1	<1			
57	415	256	<1	<1	<1	NR	NR	Fiebre botonosa mediterránea
	517	128	<1	NR	NR			
61	291	256	<1	<1	<1	"	"	Sífilis.
	456	512	<1	<1	<1			
62	389	256	<1	<1	<1	"	"	VIH+. (Lesión eritematosa, molestias faríngeas, poliartralgias)
	413	256	<1	<1	<1			
64	394	16000	>1	>1	<1	395	>256	Sífilis. (Meningitis)
	404	1024	>1	>1	<1	405	>16	
65	438	1024	<1	<1	<1	482	2	Tuberculosis (afectación renal, Polineuropatía desmielinizante, mielopatía dorsal)
	470	512	<1	<1	<1			
	603	64	<1	NR	NR			
68	662	256	>1	<1	<1	NR	NR	Fiebre Q. (Endocarditis)
69	762	1024	>1	>1	<1	"	"	Tuberculosis. (Pericarditis)
	856	512	>1	>1	<1			
	1	512	>1	1.03	0.78			
	131	512	1.7	2.13	1.16			
70	729	0	>1	<1	>1	741	<1	Fiebre botonosa mediterránea. (Meningitis)
71	742	0	>1	>1	<1	NR	NR	Fiebre botonosa mediterránea
72	843	512	<1	NR	NR	884	<1	Síndrome paraneoplásico pulmón. (Polineuropatía)
	5	512	>1	1.07	0.14			
	48	256	1.10	0.85	0.12			
90	279	256	0.91	<1	<1	NR	NR	Fiebre botonosa mediterránea. VDRL positivo
	304	512	0.76	0.66	0.07			
111	283	256	1.9	1.5	0.1	"	"	Fiebre botonosa mediterránea.
	324	512	1.4	1.1	0.4			
	453	256	2	1.7	0.36			
120	390	256	0.69	0.60	0.30	"	"	Tuberculosis ósea (parestesias)
	420	64	0.67	0.20	0.90			
126	60	512	1.09	0.14	1.70	"	"	Mononucleosis infecciosa
127	509	128	1.37	1.50	0.14	NR	NR	Meningitis criptocócica
124	630	64	1.23	0.58	0.07	"	"	Infección VIH+, Meningitis por Cándida
135	640	64	1.33	0.40	0.35	"	"	Infección VIH+, (maculopápulas eritematodescanativas, fiebre)
137	664	256	0.77	NR	NR	"	"	Fiebre Q
139	695	256	1.01	0.84	0.19	"	"	Fiebre Q
	675	128	0.85	NR	NR			
156	244	256	1.30	1.20	0.10	"	"	Sífilis. (Mielopatía por compresión)
36	454	512	<1	<1	<1	455	8	Rabdomiosarcoma embrionario primario. (Hidrocefalia)
	477	512	<1	<1	<1	478	4	
100	321	512	1.17	0.83	0.71	322	<1	Síndrome de Eaton-Lambert

Tabla 3.17.- Resultados de la serología en suero y LCR, y manifestaciones clínicas de los pacientes con serología positiva falsa.

**PACIENTES CON CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME**

BANDAS	NO PACIENTE NO SUERO	4 472	7 151	97 240	97 315	98 190	98 226	98 312	98 470	106 271
12M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63G	-	0.76	-	-	-	-	-	-	-	0.57
60M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50M	-	-	-	-	0.31	-	-	-	-	-
50G	-	-	-	-	0.26	-	-	-	-	-
45M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41M	-	-	-	-	0.13	-	-	-	-	-
41G	-	-	1.06	0.26	0.11	-	-	0.34	-	0.71
38M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38G	-	-	-	-	-	0.50	1.93	-	-	-
36M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34M	-	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-
34G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G	-	-	0.11	-	-	-	-	-	-	-
21M	-	-	0.29	-	-	-	-	-	-	-
21G	-	-	0.21	-	-	-	-	-	-	-
19M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.18.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes con criterios de borreliosis de Lyme.

(continuación)

**PACIENTES CON CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME**

BANDAS	NO PACIENTE NO SUERO	106 301	19 45	19 244	82 22	82 100	82 345	40 262	40 292	44 56
12M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63G	-	0.47	-	-	-	-	-	-	-	-
60M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60G	-	0.17	-	-	-	-	-	-	0.35	-
50M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.42
50G	-	0.12	-	0.69	-	0.12	-	-	-	0.26
45M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41M	-	-	-	-	0.36	-	-	0.21	0.70	0.29
41G	-	0.75	0.36	0.55	0.12	0.12	0.23	0.85	0.42	0.35
38M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35
36M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G	-	-	-	0.36	-	-	-	-	-	-
34M	-	-	-	-	-	-	-	0.12	-	-
34G	-	-	0.24	0.47	0.16	-	-	-	-	0.12
31M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21M	-	-	-	-	-	-	-	0.13	0.71	-
21G	-	0.14	-	0.37	0.07	-	-	-	0.25	0.05
19M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.18.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes con criterios de borreliosis de Lyme.

(continuación)

## PACIENTES CON CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

BANDAS	Nº PACIENTE Nº SUERO	83 23	87 110	103 140	104 152	104 179	107 219	108 248	124 454	124 461	125 360
72N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72G		-	-	-	-	0.34	-	0.97	0.21	1.28	-
63N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63G		-	-	-	0.11	0.13	0.46	-	-	-	-
60N		-	-	-	-	-	-	0.96	-	-	-
60G		-	-	-	-	-	-	0.22	-	-	0.12
50N		-	-	-	-	-	-	0.31	-	-	-
50G		-	-	-	-	0.19	-	0.32	-	-	-
45N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41N		0.22	-	-	-	-	-	0.60	0.18	-	0.09
41G		1.55	0.37	-	0.13	0.98	1.93	0.91	0.49	1.50	0.22
38N		-	-	-	-	-	-	0.28	-	-	-
38G		-	-	-	0.54	-	-	-	-	-	-
36N		-	-	-	-	-	-	0.53	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	0.63	0.23	-	-	-
34N		0.29	-	-	-	-	-	-	-	-	0.08
34G		0.44	-	-	-	0.11	-	-	0.31	-	0.10
31N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-
21N		0.32	-	-	-	-	0.76	0.49	0.09	-	0.06
21G		0.33	-	-	-	0.13	0.58	0.19	0.11	-	0.08
19N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.18.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes con criterios de borreliosis de Lyme.

## PACIENTES SIN CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

BANDAS	Nº PACIENTE Nº SUERO	85 77	86 68	86 97	88 169	89 212	91 181	94 317	94 444	95 307	95 356
72N		-	-	0.12	-	-	-	-	-	-	-
72G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60N		-	-	-	-	0.52	-	-	-	-	-
60G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50N		-	-	-	-	0.03	-	-	-	-	0.16
50G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22
45N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41N		-	0.33	-	-	0.57	-	-	-	-	0.16
41G		0.19	-	0.07	0.28	-	-	-	-	0.11	0.39
38N		-	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-
38G		-	-	-	0.14	0.76	-	-	-	-	-
36N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	0.29	-	-	-	-	-	-
34N		-	-	-	-	1.19	-	-	-	-	0.14
34G		-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	0.35
31N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21N		-	0.13	-	-	-	-	-	-	-	0.12
21G		0.14	-	-	0.20	-	-	-	-	0.14	0.25
19N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.19.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes sin criterios de borreliosis de Lyme.

(continuación)

## PACIENTES SIN CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

BANDAS	NO PACIENTE NO SUERO	96 138	101 269	101 269	109 224	109 242	113 313	113 465	115 341	116 459	118 442
72M 72G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.72
63M 63G	-	-	0.74	0.31	-	-	-	-	-	-	2.94
60M 60G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50M 50G	0.21	-	0.61	-	-	-	-	-	-	-	-
45M 45G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41M 41G	0.12 1.29	-	1.90	0.38	-	-	-	-	-	-	0.79
38M 38G	-	0.50	-	-	-	0.57	-	0.73	0.38	-	-
34M 34G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31M 31G	0.11 0.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21M 21G	0.15	-	-	0.37	-	0.76 0.60	-	0.69	-	-	-
19M 19G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.19.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes sin criterios de borreliosis de Lyme.

(continuación)

## PACIENTES SIN CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

BANDAS	NO PACIENTE NO SUERO	121 479	60 259	60 298	60 452
72M 72G	-	-	-	0.09	-
63M 63G	-	-	0.17	0.24	-
60M 60G	-	0.17	0.14	0.34	-
50M 50G	-	0.19	0.17	0.42	-
45M 45G	-	-	-	-	-
41M 41G	-	3.19	1.16	0.73	0.98
38M 38G	-	-	-	-	-
34M 34G	-	-	-	-	-
31M 31G	-	0.34	0.40	0.16	-
21M 21G	-	-	0.13	-	-
19M 19G	-	-	-	-	-

Tabla 3.19.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes sin criterios de borreliosis de Lyme.

PACIENTES CON SEROLOGIA POSITIVA FALSA								
BANDAS	NO PACIENTE NO SUEÑO	47 108	62 389	59 1	72 5	90 304	111 283	111 324
72H	-	-	-	-	-	-	1.12	-
72G	-	0.06	-	-	-	-	0.59	-
63H	-	-	-	-	-	-	-	-
63G	-	0.10	0.19	-	-	-	-	-
60H	-	-	-	-	-	-	-	-
60G	-	0.07	-	0.07	-	-	-	-
50H	-	-	-	-	-	-	-	-
50G	-	-	-	0.34	-	-	-	-
45H	-	-	-	-	-	-	-	-
45G	-	-	-	-	-	-	-	-
41H	-	-	-	0.23	-	-	0.57	0.17
41G	-	0.06	-	0.06	0.18	-	0.47	0.13
38H	-	-	-	-	-	-	-	-
38G	-	-	-	-	-	-	-	-
36H	-	-	-	-	-	-	-	-
36G	-	-	-	-	-	-	-	-
34H	-	-	-	-	-	-	-	-
34G	-	0.04	-	-	-	-	-	0.14
31H	-	-	-	-	-	-	-	-
31G	-	-	-	-	-	-	-	-
21H	-	-	0.18	-	-	-	0.52	-
21G	-	-	0.95	0.08	0.18	-	0.49	-
19H	-	-	-	-	-	-	-	-
19G	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.20.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes positivos falsos.

(continuación)

PACIENTES CON SEROLOGIA POSITIVA FALSA							
BANDAS	NO PACIENTE NO SUEÑO	111 453	120 390	120 420	126 60	34 454	100 32
72H	-	-	-	-	-	-	-
72G	-	0.24	-	-	-	0.21	-
63H	-	-	-	-	-	-	-
63G	-	0.07	-	-	-	-	-
60H	-	-	-	-	-	-	-
60G	-	-	-	-	-	-	-
50H	-	-	-	-	-	-	-
50G	-	0.15	-	-	-	-	-
45H	-	-	-	-	-	-	-
45G	-	-	-	-	-	-	-
41H	-	-	-	-	0.49	0.18	-
41G	-	0.08	0.61	0.11	0.22	0.49	-
38H	-	-	-	-	-	-	-
38G	-	-	-	0.14	-	-	-
36H	-	-	-	-	-	-	-
36G	-	-	-	-	-	-	-
34H	-	-	-	-	-	-	-
34G	-	-	-	-	-	0.31	-
31H	-	-	-	-	-	-	-
31G	-	0.05	-	-	-	-	-
21H	-	-	-	-	-	0.09	-
21G	-	0.16	0.17	-	-	0.11	-
19H	-	-	-	-	-	-	-
19G	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.20.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes positivos falsos.

DONANTES DE SANGRE											
BANDAS	Nº	1	3	5	9	10	11	15	16	17	18
72N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72G	-	-	0.27	-	-	0.30	0.22	0.15	-	-	-
63N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19
63G	1.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60N	-	-	-	-	-	-	0.27	-	-	-	-
60G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50N	-	-	-	-	-	-	0.25	-	-	0.25	-
50G	-	0.26	0.65	-	-	-	0.26	0.24	-	-	-
45N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41N	-	-	-	-	-	-	0.40	-	-	0.38	0.23
41G	0.14	0.27	-	-	0.25	-	0.11	0.39	0.16	0.30	-
38N	-	-	-	-	-	-	0.22	-	-	0.23	-
38G	-	-	-	-	-	-	-	0.17	-	-	-
36N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34N	-	-	-	-	-	-	0.74	-	-	0.23	-
34G	-	-	0.38	-	-	-	0.31	-	-	0.28	-
31N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-
31G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21N	-	-	-	-	-	-	0.33	-	-	0.46	0.28
21G	-	0.14	-	-	-	-	0.07	0.13	0.06	0.15	0.01
19N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.21.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los donantes de sangre.

(continuación)

DONANTES DE SANGRE		
BANDAS	Nº	
72M	-	-
72G	-	0.43
63M	-	-
63G	-	-
60M	-	-
60G	-	-
50M	-	-
50G	0.31	-
45M	-	-
45G	-	-
41M	-	-
41G	0.17	-
38M	-	-
38G	-	-
36M	-	-
36G	-	-
34M	-	-
34G	-	-
31M	-	-
31G	-	-
21M	-	-
21G	-	-
19M	-	-
19G	-	-

Tabla 3.21.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los donantes de sangre.

## PACIENTES CON SEROLOGIA POR IFI Y ELISA NEGATIVA

BANDAS	Nº	54	76	90	111	129	147	222	258	276	314
72M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72G		0.19	-	-	0.17	-	2.72	-	-	-	2.53
63M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63G		0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60G		-	-	-	-	-	0.11	-	-	-	-
50M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50G		-	0.14	-	0.16	-	-	-	-	-	-
45M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41G		0.12	-	0.21	0.69	-	1.14	-	2.00	1.51	-
38M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38G		-	0.20	-	-	-	-	-	-	-	-
36M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G		0.11	-	-	-	-	0.33	-	-	-	-
31M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21M		0.04	-	-	-	0.05	-	0.29	-	-	-
21G		0.07	-	-	0.20	-	-	-	-	-	-
19M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.22.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 en los pacientes con serología negativa por IFI y ELISA.

(continuación)

## PACIENTES CON SEROLOGIA NEGATIVA POR IFI Y ELISA

BANDAS	Nº	332	351	368
72M		-	-	-
72G		-	-	-
63M		-	-	-
63G		-	-	-
60M		-	-	-
60G		-	-	-
50M		-	-	-
50G		-	-	-
45M		-	-	-
45G		-	-	-
41M		-	-	-
41G		2.02	4.29	2.15
38M		-	-	-
38G		-	-	-
36M		-	-	-
36G		-	-	-
34M		-	-	-
34G		-	-	-
31M		-	-	-
31G		-	-	-
21M		-	-	-
21G		-	-	-
19M		-	-	-
19G		-	-	-

Tabla 3.22.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes con serología negativa por IFI y ELISA.

PACIENTES CON TUBERCULOSIS											
BANDAS	Nº	2	3	4	5	8	14	15	16	22	23
12M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12G	-	-	-	-	-	0.14	-	5.69	-	-	-
63M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63G	-	-	0.03	0.20	1.17	-	-	-	-	-	-
60M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60G	-	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-
50M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G	-	-	-	0.001	-	-	-	200.56	17.77	-	-
41M	-	0.15	-	-	-	-	3.16	-	-	-	-
41G	-	0.10	1.25	-	0.10	-	-	-	140.94	0.29	0.74
38M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.26	-
34M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21M	-	0.15	2.82	-	-	-	2.12	-	-	-	-
21G	-	0.01	0.02	-	-	-	13.44	-	-	-	-
19M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.23.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes con tuberculosis.

(continuación)

PACIENTES CON TUBERCULOSIS												
BANDAS	Nº	24	25	26	27	30	32	35	36	38	40	45
12M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12G	-	0.03	-	0.04	-	-	-	-	-	-	0.02	-
63M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63G	-	-	0.03	0.13	-	-	-	-	-	0.68	0.02	-
60M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60G	-	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G	-	0.01	-	-	0.02	-	1.05	-	-	0.01	-	0.09
41M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41G	-	0.009	0.02	0.02	-	0.03	-	0.009	0.95	0.84	-	-
38M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38G	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G	-	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.23.- Resultados del inmunoblot con la cepa B31 de los pacientes con tuberculosis.



## PACIENTES CON CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

BANDAS	Nº PACIENTE Nº SUEÑO	7 151	97 244	97 315	98 194	98 226	106 271	106 301	19 45	22 22	22 100
72G		1.62	-	-	0.02	0.32	2.34	0.94	-	-	-
63G		0.001	1.72	1.72	0.67	0.53	-	1.54	0.12	0.009	-
60G		-	1.95	1.95	-	-	-	1.55	0.67	0.00	-
50G		-	2.16	2.16	-	-	-	1.61	-	0.01	-
45G		-	2.21	2.21	-	-	-	0.007	-	0.02	-
41G		5.47	1.65	1.65	0.12	2.34	1.98	2.78	0.13	0.03	0.26
38G		-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-
36G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G		2.64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		0.35	-	-	-	0.25	0.13	-	0.03	-	-
21G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	0.03	0.08	0.05	-	0.07	-	-

Tabla 3.24.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes con criterios de borreliosis de Lyme.

(continuación)

## PACIENTES CON CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

BANDAS	Nº PACIENTE Nº SUEÑO	42 345	40 262	40 292	48 58	87 110	107 219	108 288	124 454	124 461	125 360
72G		-	-	-	-	-	-	0.85	1.04	1.10	0.92
63G		0.01	-	-	-	3.15	1.55	0.04	2.21	2.05	0.04
60G		0.04	-	-	-	-	1.60	0.07	-	-	1.55
50G		-	-	-	-	-	1.46	0.15	-	-	0.03
45G		-	-	-	-	-	-	1.38	-	-	1.70
41G		2.36	1.93	-	-	0.51	1.44	1.13	4.58	3.69	3.21
38G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	-	0.06	1.44	-	2.24	3.57	0.08
21G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		-	0.27	-	-	-	-	0.10	-	-	0.0006

Tabla 3.24.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes con criterios de borreliosis de Lyme.

## PACIENTES SIN CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

BANDAS	Nº PACIENTE Nº SUERO	85 77	86 68	88 97	88 169	95 307	95 356	96 138	101 200	101 209	109 224
72G		-	-	1.94	0.05	-	-	0.04	-	-	1.47
63G		0.01	-	-	0.009	1.41	0.76	0.05	1.88	0.55	1.60
60G		1.44	1.78	-	1.45	0.04	-	-	-	-	1.52
50G		1.62	0.04	0.21	0.09	0.07	1.46	-	-	-	0.04
45G		1.56	0.15	1.97	0.13	1.60	1.49	-	-	-	0.97
41G		3.03	0.02	2.23	1.57	1.70	2.72	2.37	0.26	1.00	1.22
38G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		0.11	-	-	0.04	0.01	0.27	-	-	-	-
21G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		0.009	-	0.01	0.02	-	0.006	-	-	-	-

Tabla 3.25.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes sin criterios de BL.

(continuación)

## PACIENTES SIN CRITERIOS DE BORRELIOSIS DE LYME

BANDAS	Nº PACIENTE Nº SUERO	113 313	115 161	60 298	60 452
72G		0.003	0.85	-	1.17
63G		0.41	0.04	1.61	1.94
60G		0.01	0.07	-	-
50G		-	0.003	-	-
45G		-	0.99	-	-
41G		0.005	2.56	2.03	4.14
38G		-	-	-	-
36G		-	-	-	-
34G		-	-	-	-
31G		0.007	1.48	1.38	3.37
21G		-	-	-	-
19G		-	6.04	6.03	6.26

Tabla 3.25.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes sin criterios de borreliosis de Lyme.

## PACIENTES CON SEROLOGIA POSITIVA FALSA

BANDAS	Nº PACIENTE Nº SUERO	62 349	69 1	72 5	111 243	111 324	120 420	126 60
72G		0.01	1.56	0.77	0.04	1.09	-	0.21
63G		2.12	1.47	1.37	1.57	-	-	-
60G		-	-	0.81	1.12	-	-	0.33
50G		-	1.56	-	-	-	-	0.007
45G		-	-	-	-	-	-	0.14
41G		0.62	1.44	1.11	0.005	1.86	-	0.16
38G		-	-	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-	-
34G		-	-	-	-	-	-	-
31G		-	1.51	0.01	-	-	-	-
21G		-	-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	1.16	0.01	-	-

Tabla 3.26.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes positivos falsos.

## DONANTES DE SANGRE

BANDAS	Nº	1	3	4	7	8	9	10	11	12	13	14
72G		-	-	-	0.23	-	-	-	0.11	0.54	0.63	0.42
63G		1.55	-	1.35	0.36	1.10	-	-	0.04	1.60	1.55	1.07
60G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50G		-	-	0.49	0.05	-	-	-	-	-	-	-
45G		-	-	0.26	0.29	-	-	-	-	-	-	-
41G		-	2.73	2.49	2.22	-	0.03	0.17	-	-	-	-
38G		-	-	0.30	0.03	-	-	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.20

Tabla 3.27.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los donantes de sangre.

(continuación)

## DONANTES DE SANGRE

BANDAS	Nº	15	16	17	18	19	20
72G		0.38	0.14	0.78	-	0.03	-
63G		1.81	0.03	0.39	0.61	0.04	0.02
60G		-	-	-	-	-	0.02
50G		-	-	-	-	-	0.13
45G		-	-	-	-	-	-
41G		-	-	-	-	0.03	-
38G		-	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-
34G		-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	-	-	-
21G		-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	-	-	-

Tabla 3.27.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los donantes de sangre.

## PACIENTES CON SEROLOGIA NEGATIVA POR IFI Y ELISA

BANDAS	Nº	76	111	147	163	314	24
72G		0.35	-	-	0.05	0.009	0.19
63G		2.30	-	0.02	-	-	0.05
60G		-	-	1.30	-	-	-
50G		-	-	0.07	-	-	-
45G		-	-	0.01	-	-	-
41G		-	1.67	1.56	-	-	0.004
38G		-	1.61	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-
34G		-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	-	-	-
21G		-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	-	-	-

Tabla 3.28.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes con serología negativa por IFI y ELISA.

## PACIENTES CON TUBERCULOSIS

BANDAS	Nº	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13
72G		0.01	-	-	-	0.16	1.10	0.13	5.23	3.60	-	-
63G		0.004	-	-	0.14	-	-	0.32	-	4.71	0.23	0.47
60G		1.34	-	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
50G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G		0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41G		0.03	0.28	0.10	0.22	0.01	7.66	-	4.56	0.63	-	-
38G		-	-	-	-	-	0.10	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.29.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes con tuberculosis.

(continuación)

## PACIENTES CON TUBERCULOSIS

BANDAS	Nº	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
72G		-	4.33	6.54	0.79	0.26	0.59	0.07	0.61	0.33	2.03	2.02
63G		6.39	2.75	-	-	2.47	-	2.77	0.20	4.34	1.45	0.18
60G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50G		-	-	-	0.14	-	-	-	-	-	-	-
45G		-	3.39	-	0.09	-	-	-	-	-	-	-
41G		-	4.93	-	0.02	-	-	-	-	0.04	2.93	2.07
38G		-	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	-	0.09	-	-	-	0.09	-	-
21G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.29.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes con tuberculosis.

(continuación)

## PACIENTES CON TUBERCULOSIS

BANDAS	Nº	25	26	29	30	32	33	34	35	39	40	41
72G		1.86	0.33	-	0.01	0.02	-	0.006	0.03	-	0.03	1.86
63G		2.38	2.75	0.57	0.75	0.85	0.04	0.74	0.71	2.24	1.21	1.66
60G		-	-	-	-	-	0.03	-	-	-	-	-
50G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45G		-	-	-	-	-	-	-	0.92	-	-	-
41G		-	-	-	-	0.58	0.74	-	-	2.34	-	-
38G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	0.05
21G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.29.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes con tuberculosis.

(continuación)

## PACIENTES CON TUBERCULOSIS

BANDAS	Nº	43	44	45
72G		-	1.72	1.52
63G		-	-	1.64
60G		-	-	-
50G		-	-	1.77
45G		0.11	-	-
41G		-	-	-
38G		-	-	-
36G		-	-	-
34G		-	-	-
31G		-	-	-
21G		-	-	-
19G		-	-	-

Tabla 3.29.- Resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 de los pacientes con tuberculosis.

## IV. DISCUSSION

El diagnóstico de certeza de un proceso infeccioso se establece con la recuperación del microorganismo causante de la enfermedad, a partir de muestras clínicas del paciente, o mediante su visualización directa. En el caso de la infección por Bb, el porcentaje de recuperación de la espiroqueta a partir de líquidos orgánicos está entre el 2 y el 6%, y a partir de la biopsia cutánea del borde del EM, entre el 6 y el 45% (106). Esto se debe al escaso número de espiroquetas existentes en los diversos órganos (106) y a la posibilidad de que la espiroqueta tenga una presencia corta en la sangre (107). El tratamiento antibiótico previo a la toma de la muestra clínica puede interferir en la recuperación de la espiroqueta (149). El medio de cultivo BSK II es un medio muy rico en nutrientes que favorece el crecimiento de otras bacterias u hongos, lo que hace menos productivo el cultivo de las muestras por la posibilidad de contaminación. Las borrelias son gérmenes de crecimiento lento, dividiéndose aproximadamente cada 12 horas (67). Ello implica que el cultivo de este microorganismo en muestras de pacientes, incluso cuando se logra, precisa demasiado tiempo (de 2 a 3 semanas) para ser útil en el diagnóstico. En nuestro estudio, el resultado del cultivo de muestras clínicas para el aislamiento de la Bb ha sido negativo. El bajo número obtenido de muestras, y la alta proporción de muestras de pacientes que habían recibido antibioterapia (8 de las 20 muestras eran de pacientes con tratamiento previo) podría explicar tal resultado. El escaso conocimiento de la infección por Bb en España, conduce a que el clínico la sospeche en pacientes en los que no haya encontrado otra etiología que pueda justificar los síntomas. La toma de muestras de los pacientes se hace cuando ya han recibido tratamiento, lo que probablemente impida la recuperación del microorganismo. Debido a que la biopsia cutánea del EM parece ser la muestra más rentable, y dado que en España no se ha conseguido aislar la Bb a partir de muestras clínicas, se impone la necesidad de insistir en el cultivo de muestras procedentes de estos de pacientes con EM para la recuperación de la cepa española de Bb. Dada la baja rentabilidad del cultivo, sería necesario un laboratorio de referencia encargado del cultivo de



estas muestras para aumentar la probabilidad de aislar la Bb.

La baja sensibilidad del cultivo para el aislamiento de la espiroqueta hace que el diagnóstico de esta infección se base fundamentalmente en la serología. Como sucede en otras enfermedades diagnosticadas mediante la serología, la valoración clínica, con exclusión de otras etiologías, es esencial. La infección por Bb produce una gran variedad de síntomas y signos, en muchos casos inespecíficos, que pueden conducir erróneamente al diagnóstico de esta enfermedad, cuando no se trata de ella. Hemos basado la valoración clínica de los enfermos en los criterios del CDC parcialmente modificados (145) para ser más estrictos y homogeneizar los criterios. Hemos incluido la acrodermatitis crónica atrófica y el linfocitoma, pues en Europa se ha demostrado claramente la asociación entre estas entidades y la BL (19). Es importante insistir sobre la existencia de unos criterios clínicos en los que basarse para diagnosticar casos de infección por Bb, con fines epidemiológicos y de valoración de técnicas (145). La utilización indiscriminada de las técnicas serológicas para el diagnóstico de esta infección, conduce al aumento en el número de falsos positivos. Por otra parte, tampoco se pueden desestimar desde un punto de vista terapéutico los casos con serología positiva para Bb pero sin criterios BL, por la posibilidad de la existencia de manifestaciones clínicas de infección por Bb atípicas o desconocidas.

Siguiendo los criterios del CDC parcialmente ampliados hemos clasificado los pacientes con serología positiva para Bb dependiendo de si cumplían o no los mismos. Hemos considerado a los pacientes con serología positiva pero con otra etiología que pudiera justificar los síntomas como positivos falsos. Dado que el cultivo no es productivo, hemos utilizado la clínica del enfermo como "gold standard" para la valoración de la serología.

Para el estudio de la serología, hemos obtenido un total de 1991 muestras (sueros y LCR) correspondientes a 1500 pacientes, entre Enero de 1987 y Diciembre de 1992. De estos pacientes, 136

tuvieron serología positiva y 64 de ellos cumplían criterios de BL. El número de pacientes diagnosticados fue aumentando con los años, alcanzando un pico máximo en 1989 para comenzar a decrecer después (7 en 1987, 13 en 1988, 19 en 1989, 12 en 1990, 9 en 1991 y 4 en 1992). El número de muestras siguió una curva similar obteniéndose 160, 352, 439, 373, 395 y 273 en los años 1987, 1988, 1989, 1990, 1991 y 1992 respectivamente. Esta distribución de los pacientes diagnosticados de infección por Bb a lo largo de los años puede ser debido a varias razones. La campaña de captación de casos comenzó en 1987 y se mantuvo durante los dos siguientes años. A partir de entonces los médicos comenzaron a enviar muestras obteniendo el mayor número de ellas dos años después. Además, con el diagnóstico en nuestro laboratorio de casos provenientes de otros hospitales de España, comenzaría la puesta en marcha de las técnicas serológicas en otros laboratorios, lo que llevaría al descenso en el envío de muestras.

La mayor parte (64%) de los enfermos con criterios de BL procedían de hospitales del centro de España: 32 casos de Madrid y 10 casos de las provincias más próximas (3 de Segovia, 2 de Avila, 1 de Valladolid, 3 de Guadalajara y 1 de Badajoz). El 23% de los pacientes eran del Norte de España: 8 casos de Asturias, 4 de Barcelona y 2 de La Coruña. Hubo un 5% que procedían de hospitales del Sur de España (3 de Málaga y 2 de Córdoba). Por último un paciente (2%) era de Badajoz y uno de Valencia (2%). Estos resultados pueden estar sesgados por el mayor contacto tenido con los hospitales a los que pertenecían los pacientes con serología positiva. De hecho, en el grupo de 100 pacientes con serología negativa estudiados como control negativo, el 55% de ellos procedían de Madrid, y el resto estaban distribuidos con frecuencias similares a los casos diagnosticados de BL. A pesar de ello, la procedencia de nuestros casos concuerda con la descrita por Anda y cols. en la menor frecuencia de casos en el sur de España que en el resto de la península (150).

Se impone la necesidad de estudios epidemiológicos que



delimiten las zonas endémicas y donde el índice de sospecha deba ser mayor. En España se han realizado estudios de seroprevalencia en La Rioja (151), donde el porcentaje de individuos con serología positiva para Bb estaba entre el 3% y el 30%. En esta misma provincia se hizo un estudio por inmunofluorescencia con garrapatas Ir en el que el 11% de las garrapatas fueron positivas (80). En Sevilla la seropositividad en pacientes sin sintomatología de infección por Bb era del 1.3% (152) y en Valladolid del 10.5% (153). En nuestro estudio hemos tenido casos de BL en otras provincias de España en las que sería interesante conocer la seroprevalencia para la mejor valoración de las técnicas serológicas.

La edad media de los pacientes con serología positiva fue de 43 años, correspondiendo ésta a la edad del hombre medio activo. Por otra parte el 65% de estos pacientes eran varones y el 35% mujeres. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución por sexo con respecto al grupo de pacientes con serología negativa utilizado como control, en el que la proporción de varones fue menor (42% varones y 58% mujeres). La mayor frecuencia de varones en el grupo de pacientes con serología positiva puede ser debida a que probablemente son éstos los que pueden tener mayor exposición al vector por sus salidas al campo o por actividades como caza, etc.

La mayoría de los pacientes con serología positiva procedían de servicios de Neurología (36%). Le seguía los servicios de Infecciosas y Microbiología (32%) y los de Dermatología (14%). El Servicio de Medicina Interna envió al 9.5% de los pacientes. El grupo de pacientes con serología negativa (control negativo) tuvo una distribución por servicios médicos similar, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Esto haría suponer la mayor concienciación por parte de los neurólogos de la existencia de esta enfermedad, y por lo tanto la probable mayor captación de casos procedentes de estos servicios.

La picadura de garrapata, el ambiente rural y el contacto

con animales son los antecedentes epidemiológicos más frecuentes en los tres grupos de pacientes con serología positiva para Bb (pacientes con criterios de BL, pacientes sin criterios y positivos falsos). Sin embargo, sólo el 51% de los 136 pacientes con serología positiva tuvieron datos epidemiológicos que justificaran la sospecha de BL. El carácter retrospectivo en la valoración de los casos clínicos y por tanto la falta de interrogatorio dirigido a este respecto podría justificar la baja frecuencia de antecedentes epidemiológicos en nuestros enfermos. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la epidemiología entre los tres grupos de pacientes con serología positiva. Por ello, no podríamos descartar que la seropositividad en los pacientes sin criterios de BL y en los pacientes positivos falsos pudiera ser debida a una infección asintomática por Bb, aunque ésta no sea responsable de su clínica, y que pudiera justificar parte de las reacciones cruzadas con otras enfermedades. Es muy probable, por otro lado, que entre los pacientes sin los criterios de BL existan individuos con la enfermedad.

Entre el grupo de pacientes con serología negativa (grupo control) y el de pacientes con serología positiva (136 pacientes) se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de picadura de garrapata (mayor en el segundo grupo), pero no en cuanto al ambiente rural y el contacto con animales. La falta de interrogatorio por parte del clínico en algunos casos y la falta de este dato en otros podría sesgar estos resultados. A pesar de ello, el antecedente de picadura de garrapata podría ser un dato muy importante, pues en nuestra serie sólo el 16% de los pacientes recuerdan picadura de garrapata coincidiendo con lo descrito en la literatura en que menos del 50% lo hacen (154).

La infección por Bb produce manifestaciones cutáneas, articulares, neurológicas y cardiológicas. De los 64 pacientes con criterios de BL, 20 (31%) presentaron manifestaciones cutáneas. Hubo diecisiete casos de EM (27%). Este número de casos

coincide con lo descrito en Europa, donde el porcentaje de pacientes con EM oscila entre el 12.7% al 60% (155), mientras que es mucho menor que el de EEUU (del 60% al 80%). Por otra parte, Anda y col.(150) recogen 9 casos de EM y hacen una revisión de los casos publicados en España llegando a ser un 26% los pacientes con EM. En nuestro estudio, diez de los 17 pacientes (59%) con EM presentaron esta lesión como única manifestación. Hay que tener en cuenta que la escasa sensibilización hacia la enfermedad de los dermatólogos puede hacer que se diagnostiquen menos casos de los que realmente existen. Por otra parte el tratamiento antibiótico en este estadio de la enfermedad puede evitar la progresión de la misma, por lo que habría que insistir sobre la concienciación por parte del clínico de la existencia de esta infección. Ha habido dos casos de ACA y un caso de linfocitoma. Hemos incluido estas manifestaciones como manifestaciones cutáneas de la infección por Bb a pesar de no cumplir los criterios del CDC porque aunque estas lesiones son muy poco frecuentes en Estados Unidos, en Europa se han relacionado claramente con esta enfermedad (156).

El número de pacientes con artritis ha sido del 28%. Este número es más elevado que el encontrado por Anda y col. (150), en que sólo un 7% de los pacientes padecen artritis, e incluso más elevado que lo descrito en Europa, en que la incidencia de artritis está entre el 0.7% y el 24% (155). A diferencia de lo ocurrido en Europa, en EEUU la artritis es la manifestación más frecuente de BL.

Las manifestaciones neurológicas aceptadas por el CDC han afectado a 40 pacientes (62.5%), siendo así la mayoría de los pacientes con infección por Bb en nuestro estudio. Este dato coincide con la incidencia de este tipo de manifestaciones en Europa, que está entre el 18.3% y 62.1% (155), mientras que en EEUU la frecuencia de manifestaciones neurológicas es menor (99). La mayoría de los pacientes con serología positiva procedían del servicio de Neurología, por lo que estos resultados podrían estar sesgados por la mayor concienciación por parte del neurólogo en

la existencia de esta enfermedad. Sin embargo, en el grupo control de pacientes con serología negativa la incidencia de manifestaciones neurológicas fue inferior de forma estadísticamente significativa a la de pacientes con criterios de BL. Por ello pensamos que ese sesgo posible no ha influido en la frecuencia de manifestaciones neurológicas. Sólo 13 (42%) de los 31 pacientes con manifestaciones neurológicas a los que se realizó serología en LCR resultaron positivos, indicando que probablemente la serología en LCR tiene una sensibilidad baja en pacientes con algún tipo de manifestación neurológica.

El porcentaje de afectación cardiológica ha sido del 3%. Este dato también coincide con la literatura europea en la que se describe que la incidencia de carditis está entre el 3% y el 6% (155).

En Europa, se han diagnosticado con mayor frecuencia las manifestaciones neurológicas y con menor incidencia las articulares. Los casos de ACA y linfocitoma son bien conocidos. En América, sin embargo, ha habido más casos de BL con manifestaciones articulares y menos frecuentes han sido las neurológicas. Las razones posibles para justificar esta variabilidad geográfica son de tres tipos: diferencias en el poder patogénico de las distintas cepas, diferencias en la reactividad del huésped de acuerdo con factores genéticos, y secundarias al diverso grado de alerta de los clínicos al sospechar la enfermedad. Recientemente se ha documentado variabilidad fenotípica y genotípica entre diversos tipos de *Borrelia* productoras de BL. Se separaron tres genopecies mediante análisis de secuencias del RNAr 16s (*Bb sensu stricto*, *B. garinii* y grupo VS461) y siete serotipos definidos por la reactividad con anticuerpos monoclonales frente a diversos epitopos de la proteína OspA (63,64). Wilske y col. han sugerido diferentes potenciales patogénicos y organotrópicos de los distintos serotipos OspA. La distribución geográfica de esas especies es heterogénea y quizás pueda explicar en parte las diferentes manifestaciones clínicas. *Bb sensu stricto* parece ser

la única que está presente en EEUU mientras que ésta coexiste con B. garinii en el oeste de Europa y con el grupo VS461 en el norte de Europa.

Las técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de laboratorio de infección por Bb han sido la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), el enzaimunoen ensayo (ELISA) y el inmunoblot.

Los sueros analizados por IFI y ELISA han sido los obtenidos en el período de Enero de 1987 a Diciembre de 1992. Para el estudio del inmunoblot hemos estudiado los sueros que tuvieron algún resultado positivo por IFI y/o ELISA entre Enero de 1990 y Junio de 1991.

Hemos valorado los resultados de IFI y ELISA por una parte en la totalidad de los sueros obtenidos de los pacientes y, por otra, teniendo en cuenta sólo el primer suero recibido de los mismos, por considerar que supuestamente el paciente no ha estado sometido a tratamiento antibiótico previo y, por tanto, es el suero más intacto (139). Para calcular la especificidad de las técnicas serológicas, hemos estudiado sueros de donantes de sangre obtenidos en el Banco de Sangre del Hospital Ramón y Cajal (50 para IFI y 116 para ELISA).

En el grupo de pacientes con criterios de BL (64 pacientes), la sensibilidad de IFI teniendo en cuenta la totalidad de los sueros ha sido del 75% y del ELISA del 62%. Los datos de sensibilidad y especificidad de IFI y ELISA descritos en la literatura difieren de unos trabajos a otros. Cutler et al. consideran que el ELISA es más sensible y específico que el IFI (157), mientras que Magnarelli et al. no observan diferencias significativas entre ambas técnicas (158). En nuestro caso la sensibilidad del IFI fue mayor que la del ELISA, sin embargo al comparar los datos de los distintos laboratorios hay una serie de factores que hay que tener en cuenta: tipo de técnica desarrollada, criterio de positividad, criterio de definición de grupo control y tipo de clasificación de los pacientes

(dependiendo del estadio de la enfermedad o atendiendo a características clínicas en general).

En la puesta a punto de las técnicas serológicas, el método para la preparación del antígeno, la cepa empleada e incluso el pase de la cepa (59) y el medio empleado, son factores que hacen que en muchas ocasiones no sean comparables los resultados de unos laboratorios con los de otros.

El criterio de positividad parece ser más fácil en el ELISA que en el IFI, puesto que en este último la subjetividad del lector podría influir en los resultados, mientras que la automatización del ELISA haría más fácil y objetiva la interpretación de los mismos. Sin embargo, este factor parece no interferir en el estudio de Magnarelli et al. (158), lo que nos hace pensar que la lectura de la fluorescencia por parte de personal especializado es clave a la hora de interpretar los resultados.

El criterio de elección del grupo control también hace que varíen los resultados. En el ELISA, para elegir el punto de corte a partir del cual considerar el resultado positivo, se analiza un grupo de donantes de sangre supuestamente sanos, se hace la media de las densidades ópticas obtenidas, y se calcula el punto de corte sumando a esa media 2 ó 3 desviaciones standard. Por lo tanto, el número de donantes y el criterio elegido puede influir en los resultados.

El estadio de la enfermedad en que se encuentre el paciente en la obtención del suero es otro factor importante. La BL se desarrolla por lo general en tres etapas. Comienza con la aparición del EM en el lugar de la picadura de la garrapata. Semanas o meses después puede aparecer afectación del sistema nervioso o cardiológico, y finalmente pueden aparecer manifestaciones articulares como la artritis. No obstante, en muchas ocasiones las distintas manifestaciones se solapan, por lo que la clasificación de los pacientes dependiendo del estadio en



el que se encuentre es difícil. Algunos de los pacientes de nuestro estudio se han valorado prospectivamente, mientras que de la mayoría se ha hecho la valoración de la historia clínica de manera retrospectiva. Este es el motivo por el que se han analizado sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas en la totalidad de los sueros. También hemos estudiado los valores de sensibilidad en el primer suero recibido de los pacientes, a pesar de no encontrarse en el mismo estadio de la enfermedad. En este caso, la sensibilidad de las dos técnicas se ve incrementada: 81% para IFI y 73% para ELISA. El aumento de la sensibilidad en el primer suero recibido de los pacientes puede ser debido a que con el tratamiento antibiótico la respuesta inmunológica de los pacientes disminuye (139); por otra parte, el título de anticuerpos tiende a ir bajando con el paso del tiempo, permaneciendo elevados sólo en los casos de infección crónica (145).

El título de IFI que hemos considerado positivo fue el igual o mayor a 1/256. No hubo diferencias en los títulos de IFI en los distintos grupos. Esto puede implicar que el título de IFI no tiene valor discriminatorio y que el aumento del punto de corte en el título de IFI no aumenta necesariamente la especificidad de la técnica mientras que puede generar un detrimento de la sensibilidad.

El bajo porcentaje de casos con ELISA IgM positivo implica el escaso número de pacientes diagnosticados tempranamente. Por otra parte, el gran número de pacientes con criterios de BL que tuvieron ELISA (IgG&IgM) positivo y fueron negativos al analizar ELISA IgG y ELISA IgM individualmente (22%) indica la menor sensibilidad de los ELISAS individuales en el diagnóstico de la infección por Bb. Sin embargo, en el grupo de pacientes sin criterios de BL y en el de positivos falsos, tampoco los ELISAS individuales IgG e IgM descartaron tal infección, pues sólo el 32% y el 24% respectivamente fueron negativos en ambos ELISAs. Estos resultados pueden estar sesgados porque sólo se analizaron mediante los ELISAs individuales aquellos sueros que tuvieron

resultado positivo en el ELISA (IgG&IgM). A pesar de ello, la utilización de los ELISAs individuales en nuestras manos no aporta buenos resultados, por lo que su uso probablemente se podría limitar.

De los 47 sueros de los pacientes que presentaron EM, 35 (74.5%) fueron IFI positivo y 30 (67%) fueron ELISA positivo. Considerando sólo el primer suero de los pacientes, las sensibilidades de IFI y ELISA fueron 82% y 75% respectivamente. La alta sensibilidad de ambas técnicas en estos pacientes no coincide con la literatura, en la que se describe que la sensibilidad se aproxima al 50% cuando se trata de una fase temprana de la enfermedad (111). La mayoría de los pacientes de este estudio fueron analizados retrospectivamente y el diagnóstico de la infección es hospitalaria donde los enfermos llegan con un cuadro más avanzado que a la asistencia primaria. En muchos casos puede que los sueros obtenidos de los enfermos no coincidan con la fase temprana de la enfermedad sino que se hayan obtenido más tardíamente, cuando la respuesta inmune es mayor. También el desconocimiento por parte del clínico de la existencia de la enfermedad puede retrasar la obtención del suero, lo que justificaría estos resultados.

En el grupo de pacientes sin criterios de BL obtenidos en nuestro trabajo, la especificidad de IFI y ELISA es muy baja (30% y 39% respectivamente). El envío de muestras de manera indiscriminada o sólo con la intención de descartar esta enfermedad en casos con difícil diagnóstico puede conducir a estos resultados. Sin embargo, es probable que parte del grupo, a pesar de no cumplir los criterios de BL, sean pacientes con infección por Bb. La posibilidad de que enfermedades como la morfea y la esclerosis múltiple sean debidas a esta espiroqueta está muy debatida, si bien se ha detectado el genoma de la Bb en biopsias cutáneas de lesiones de morfea por PCR (159), y hay datos de seroconversión para Bb en pacientes con esclerosis múltiple (160). En nuestro estudio, hay 6 pacientes con morfea y 7 con esclerosis múltiple. El que se trate o no de infección por

Bb es difícil de aclarar.

En el grupo de los 24 pacientes positivos falsos, la especificidad fue del 27% por IFI y 60% por ELISA. Muchos de los casos eran pacientes diagnosticados de sífilis y VIH, coincidiendo con lo descrito en la literatura (114,116,161). Valorando este grupo de pacientes con serología positiva y con otra etiología que justificara los síntomas, encontramos un alto porcentaje de pacientes diagnosticados de tuberculosis (17%). Esta reacción cruzada ha sido muy poco descrita en la literatura (60,126) y para estudiarla realizamos un estudio con 50 pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo. De ellos, tres tuvieron RPR positivo y fueron excluidos del estudio. Se analizaron estos pacientes por ELISA (IgG&IgM), resultando ser positivos el 17% de ellos. Por lo tanto la especificidad fue del 83%. La alta incidencia de tuberculosis en nuestro país hace que a la baja frecuencia de infección por Bb se le una la dificultad por la existencia de reacciones cruzadas con esta entidad. Por ello, hemos visto necesaria la valoración de otras técnicas como el inmunoblot para el estudio de este tipo de pacientes.

La especificidad en el grupo de donantes de sangre ha sido del 100% en el IFI y del 97.5% en el ELISA. Estos datos coinciden claramente con los obtenidos por Russell y col. (111).

Para valorar la concordancia entre IFI y ELISA hemos utilizado el índice kappa ( $k$ ). Este índice calcula el grado de concordancia entre dos variables, y elimina aquella que pueda ser debida al azar. La escala de valoración del índice  $k$  se clasifica en las categorías de pobre ( $k > 0.00$ ), ligera ( $k = 0.00 - 0.20$ ), mediana ( $k = 0.21 - 0.40$ ), moderada ( $k = 0.41 - 0.60$ ), sustancial ( $k = 0.61 - 0.80$ ) y casi perfecta ( $k = 0.81 - 1$ ) (147). El índice  $k$  en la totalidad de los sueros estudiados tiene un valor de 0.31, lo que corresponde a una concordancia mediana. Si calculamos dicho índice en cada uno de los tres grupos en que hemos clasificado los pacientes, observamos que en el grupo de pacientes con criterios de BL alcanza un valor de 0.46 (concordancia moderada),

en el grupo de pacientes que no cumplen los criterios de BL tiene un valor de 0.2 (concordancia ligera), y en los pacientes positivos falsos el índice  $k$  es de 0.04 (concordancia pobre). También hemos calculado este valor en el grupo de pacientes con EM, pues cumplen el criterio clínico definitivo de infección por Bb. En estos pacientes el índice  $k$  es de 0.72, que corresponde a una concordancia sustancial casi perfecta. Con estos resultados podemos ver que las técnicas serológicas tienen mayor grado de concordancia en los pacientes que podemos considerar con infección por Bb, mientras que ésta es menor en los pacientes sin criterios de infección. En los pacientes en los que hay otra etiología que pueda justificar los síntomas, el valor del índice  $k$  es prácticamente 0, lo que corresponde a una concordancia pobre. De estos datos se deduce que aunque la sensibilidad de IFI es mayor a la del ELISA, probablemente sea necesaria la utilización de ambas técnicas para el diagnóstico de casos de infección por Bb pues la concordancia de las dos técnicas en el análisis de los sueros aumentaría la fiabilidad en el resultado, y por lo tanto la posibilidad de diagnosticar casos de BL cuando se trata de ellos.

Utilizando la cepa B31 de Bb hemos analizado por inmunoblot los sueros de los pacientes que durante el período de Enero de 1990 a Junio de 1991 fueron positivos por IFI y/o ELISA, y por lo tanto eran sugestivos de padecer infección por Bb. Igualmente hemos utilizado 20 sueros de pacientes con resultados negativos por ambas técnicas, y 20 sueros de donantes de sangre obtenidos en el Banco de Sangre del Hospital Ramón y Cajal. Hemos incluido en este estudio los 50 pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo, que previamente habían sido analizados por ELISA (con una especificidad del 83%), con la finalidad de ver qué valoración tiene el inmunoblot en este grupo de pacientes.

El empleo del inmunoblot para el diagnóstico de la borreliosis de Lyme tiene dos inconvenientes fundamentales. Por una parte esta técnica es más laboriosa que otras como IFI o ELISA y requiere aparatos más caros y sofisticados. Además, el

criterio de positividad empleado varía mucho de unos laboratorios a otros, haciendo que la interpretación de los resultados sea difícil y en muchos casos no comparable.

En 1988 Grodzicki y Steere obtenían los mejores resultados en el análisis del inmunoblot al utilizar como criterio de positividad en un suero obtenido en la fase aguda de la enfermedad, la aparición de 2 o más bandas de tipo IgM, o bien 4 o más de tipo IgG, o al menos una de cada tipo. Un suero de la fase convaleciente era positivo cuando aparecían bandas distintas a las de la fase aguda (118). Con este criterio resultaba que el inmunoblot era más sensible y específico que el ELISA en la etapa temprana de la enfermedad (primeros 30 días después de la aparición del EM). Por otra parte la especificidad en la etapa tardía no era mejor; concluían que debido a la dificultad en la realización del inmunoblot, éste probablemente debería aplicarse sólo a los pacientes con difícil diagnóstico. En 1989 Karlsson et al. consideraban el inmunoblot positivo cuando aparecía la banda de 41kDa y una de bajo peso molecular (18, 21.5 ó 23 kDa) (162). Se basaban en estudios previos que demostraban que los anticuerpos frente al antígeno de 41kDa eran los primeros en aparecer durante la enfermedad y que la mitad de los pacientes con infección por Bb tenían anticuerpos frente a proteínas de bajo peso molecular. De su trabajo, concluían que el inmunoblot era más sensible que el ELISA en las fases tempranas de la infección, sin embargo no era más específico, por lo que podría ser buen complemento para el ELISA. Raoult et al. (161) consideraron que de los criterios utilizados para el inmunoblot en el estudio de Grodzicki, bastaba con que hubiera más de 3 bandas para considerar un resultado positivo. Limitaban finalmente la utilización del inmunoblot a la confirmación de otras técnicas serológicas. Otros grupos (163) consideraban la presencia de 4 bandas en el inmunoblot como criterio de positividad, si bien proponían la necesidad de la utilización combinada de ELISA e inmunoblot en el diagnóstico de la borreliosis de Lyme.

A la variación en el criterio de positividad se une el hecho de que la presencia de bandas frente a antígenos de Bb en el inmunoblot no está limitada a pacientes con BL. Karlsson et al. (162) y Hanser et al. (60) observaron que pacientes con enfermedades de etiología diferente a la infección por Bb resultaban ser positivos en el análisis por inmunoblot. Otros autores demostraban la presencia de múltiples bandas en el inmunoblot de sueros de donantes de sangre, supuestamente sanos (164), con lo que la dificultad en la interpretación de los resultados del inmunoblot se veía incrementada.

Además del problema de la elección del criterio de positividad y la existencia de falsos positivos en el análisis del inmunoblot hay otro inconveniente, que es la subjetividad en la lectura de las bandas. A pesar de que en 1988 Grodzicki (118) proponía el empleo del densitómetro para objetivar dicha lectura, no es hasta 1992 cuando Pachner et al. utilizan esta técnica (165). Para obtener el criterio por el cual considerar un inmunoblot positivo, utilizan 23 sueros de donantes de sangre. Calculan la media de cada una de las bandas resultantes de la lectura por densitómetro y le suman 3 desviaciones standard. Todas aquellos sueros cuyas bandas tuvieran valores por encima de los calculados a partir de los donantes de sangre, tendrían inmunoblot positivo. Con este método, obtienen unos valores de sensibilidad y especificidad altos, con lo que proponen la utilización del densitómetro para la valoración del inmunoblot.

En nuestro estudio hemos utilizado el densitómetro para la lectura de las bandas resultantes del inmunoblot. Para la valoración de los resultados hemos empleado la regresión logística. El método utilizado por Pachner et al. (165), en el que emplea la media más dos o tres desviaciones standard para el cálculo del punto de corte del inmunoblot, implica la distribución normal de las bandas. Es difícil la demostración de la distribución normal de unas variables cuando se tiene un número tan bajo de individuos (23 donantes de sangre). Utilizar la teoría de la distribución normal cuando no se cumple conduce

a conclusiones de validez sospechosa. En nuestro trabajo, hemos estudiado 20 sueros de donantes y hemos comprobado que los resultados obtenidos en el inmunoblot no seguían una distribución normal. La regresión logística no asume la normalidad en la distribución de las variables, por lo que la hemos aplicado en la evaluación de nuestros resultados. Otra ventaja que tiene la utilización de la regresión logística es que se trata de un análisis multivariante que analiza todas las bandas en conjunto, a diferencia de lo que ocurre en el trabajo de Pachner et al. (165), en el que cada banda era considerada independiente de las demás. Se estudian así patrones completos de reactividad y el significado del inmunoblot se puede interpretar aplicando la fórmula obtenida.

La regresión logística compara los datos de dos grupos de individuos, y obtiene un modelo predictivo según el cual se clasifican lo mejor posible estos individuos en los grupos correspondientes. Hemos realizado dos estudios. En el estudio 1 hemos clasificado los individuos en pacientes con criterios de BL y donantes de sangre (individuos supuestamente sanos), y en el estudio 2 la clasificación ha sido en pacientes con BL (el mismo grupo utilizado en el primer estudio), y pacientes sin BL (individuos que no cumplían los criterios e individuos con otra etiología que justificara los síntomas). Hemos empleado el primer suero recibido de cada paciente, pues es el suero más temprano en la evolución clínica. Una vez obtenido el modelo, éste se aplica mediante una fórmula a los resultados del inmunoblot de los distintos individuos, sabiendo así si dichos individuos quedarían clasificados como individuos con infección por Bb o no. Se han llevado a cabo los dos tipos de estudios con la finalidad de ver si hay diferencias en la utilización como grupo control individuos supuestamente sanos (donantes de sangre), o individuos enfermos pero con otra etiología distinta a la que se analiza.

Los resultados que hemos obtenido del inmunoblot reflejan igual sensibilidad en los dos estudios, cuando se analizan los datos del primer suero recibido de cada paciente (76.5%). Cuando

analizamos los resultados en los sueros siguientes, la sensibilidad baja (55% en el estudio 1 y 36% en el estudio 2). Esta disminución en la sensibilidad se puede explicar por la misma razón que en el caso de IFI y ELISA: la respuesta inmune puede verse afectada por el tratamiento antibiótico recibido (139). Si consideramos la totalidad de los sueros, la sensibilidad del inmunoblot es del 68% en el estudio 1 y 61% en el estudio 2. Con estos resultados y sin tener en cuenta la especificidad de la técnica, deducimos que sería mejor la utilización de la fórmula obtenida en el estudio 1 para valorar los pacientes sugestivos de padecer infección por Bb, pues se obtiene una sensibilidad mejor. No obstante, como el inmunoblot sería un método de confirmación y no un método de despistaje, nos interesaría más que tuviese una buena especificidad.

En cuanto a las especificidades calculadas en los distintos grupos de individuos podemos ver que en todos los grupos de pacientes sin Lyme, son más bajas en el estudio 1 que en el 2 (pacientes sin criterios de BL: 46% frente a 50%; positivos falsos: 62% frente a 85%; pacientes con tuberculosis: 89% frente a 91.5%); sin embargo, no es así en los donantes de sangre, en que se obtiene una especificidad en el estudio 1 del 90%, y en estudio 2 del 80%. La baja especificidad en el grupo de donantes de sangre coincide con la de otros autores, que tratan de justificar tal resultado por la posibilidad de la respuesta inmune frente a espiroqueta saprófitas de la boca (166). Weiland y col. (167) encuentran que el 7.2% de los donantes de sangre tenían ELISA positivo, y de éstos el 37.5% fueron confirmados por inmunoblot. Concluyen, dando mayor importancia a este resultado, que la detección de anticuerpos frente a Bb como método de despistaje no es un buen método para prevenir la transmisión de la enfermedad por transfusión. En definitiva, el hecho de que las especificidades en los distintos grupos de pacientes sean mayores en el estudio 2 que en el 1, nos hace pensar que es mejor utilizar la fórmula obtenida de esos datos. Además, probablemente sea más correcto en estudios clínicos la utilización como grupo control de casos con otras enfermedades que puedan confundirse



con la estudiada, pues el clínico hace el diagnóstico diferencial con este tipo de pacientes y no con donantes de sangre.

La sensibilidad del inmunoblot con la cepa B31 es mejor utilizando el estudio 1. Teniendo en cuenta la especificidad, ésta es mejor en el estudio 2. Si comparamos estos resultados con los obtenidos por IFI y ELISA, vemos que el IFI es el que tiene mayor sensibilidad de las tres técnicas (75%). Si consideramos el estudio 1, el ELISA es menos sensible que el inmunoblot (62% frente a 68%) y considerando el estudio 2, prácticamente ambos tienen la misma sensibilidad (62% y 61%). A pesar de que la sensibilidad del inmunoblot es mayor en el estudio 1 que en el estudio 2, el hecho de que en este último se obtiene una sensibilidad en el inmunoblot muy similar a la del ELISA, unido a la mayor especificidad del inmunoblot en el estudio 2 que en el 1, nos hace pensar que el estudio 2 es el más adecuado para el diagnóstico de la BL, y por lo tanto la fórmula que proponemos para la interpretación del inmunoblot en pacientes con una serología positiva es:  $\ln(p/q) = -2,07828 + (-10,18426 \times G72) + (7,29118 \times G63) + (18,72080 \times G60) + (4,1442 \times M41) + (8,02014 \times G38) + (11,74381 \times G34) + (12,43657 \times M21) + (-8,59503 \times G21)$ .

Si comparamos las especificidades del inmunoblot, del IFI y del ELISA, y utilizando la fórmula, vemos que en los pacientes sin criterios de BL el inmunoblot es el que tiene mayor especificidad (50% frente a 30% de IFI y 39% de ELISA). A pesar de ello, es una especificidad muy baja. La probabilidad de que parte de esos pacientes realmente padezcan una BL o de que la hayan padecido previamente podría explicar estos resultados.

El grupo de pacientes positivos falsos han tenido unas especificidades en IFI, ELISA e inmunoblot de 27%, 60% y 85% (si consideramos el estudio 2 como el más adecuado). Esto implicaría que definitivamente el inmunoblot podría ser la mejor técnica para eliminar las reacciones cruzadas en este tipo de pacientes. De la misma manera, en el estudio realizado en los pacientes con tuberculosis, vemos que la especificidad del inmunoblot es mayor

en el estudio 2 que en el 1 (91.5% y 89% respectivamente). En cualquier caso, el inmunoblot es mejor que el ELISA (con una especificidad del 83%) para eliminar la reacción cruzada entre la infección por Bb y la tuberculosis. Estos datos siguen apoyando nuestra hipótesis de que la fórmula propuesta para valorar el inmunoblot será de ayuda en aclarar el significado de una serología positiva. Nos permitirá discriminar entre positivos verdaderos y positivos falsos. Puede ofrecer al clínico la probabilidad cuantificada de que el paciente tenga una BL o pertenezca al grupo de positivos falsos. Este dato nos parece que podría ser de una inestimable ayuda en el manejo de los pacientes.

El análisis del inmunoblot con la cepa española Esp-1, aislada de la garrapata Ir, refleja en general peores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad que los obtenidos con la cepa americana B31. Se han realizado con la cepa española los estudios 1 y 2, al igual que con la B31, sin embargo, sólo se ha analizado el inmunoblot para detectar anticuerpos de tipo IgG, debido a la baja frecuencia de pacientes con criterios de infección por Bb que captaban bandas de tipo IgM en el inmunoblot con la cepa B31. Este factor probablemente haga que ambos análisis no sean comparables, pues la regresión logística se ha hecho utilizando variables diferentes en ambas técnicas.

En base a los resultados del inmunoblot con la cepa Esp-1 vemos que la sensibilidad es mayor en el estudio 1 que en el 2. La especificidad en los distintos grupos de pacientes sólo es mayor en el estudio 2 que en el 1 en el caso de los pacientes con serología positiva falsa, siendo éstos los casos en los que la interpretación de los resultados debe ser más estricta. Según estos datos, quizás habría que elegir el estudio 2 de acuerdo con la mayor especificidad obtenida en el grupo de pacientes positivos falsos, a pesar de que la sensibilidad se ve débilmente afectada con respecto al estudio 1. Hay que tener en cuenta que estos resultados pueden estar sesgados no sólo porque se han analizado únicamente los anticuerpos de tipo IgG, sino también

porque el inmunoblot se ha realizado, además de en otros grupos de individuos, en los sueros de los pacientes que previamente habían resultado positivos por IFI y/o ELISA con la cepa B31. La cepa Esp-1 es una cepa recientemente aislada de la garrapata Ir (7). A pesar de que no encontramos diferencias notorias en cuanto al patrón proteínico de las dos cepas, es bien sabida la variabilidad genética, proteínica e inmunogénica de las distintas cepas de Bb (55,56). En nuestro estudio hemos observado grandes diferencias en cuanto al patrón de reactividad de los sueros con respecto al inmunoblot con la cepa B31. Hasta el momento no se han realizado estudios de valoración de técnicas serológicas con la cepa Esp-1, por lo que tampoco podemos comparar nuestros resultados con otros. Sin embargo, consideramos la necesidad de más estudios con la esta cepa no sólo en el inmunoblot, sino también en IFI y ELISA, pues la utilización de distintas cepas en las técnicas serológicas hace que no sean comparables unas con otras (59).

La necesidad de que cada laboratorio analice sus propios resultados para valorar la sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas se basa en las discrepancias existentes entre los distintos laboratorios (168). La reproducibilidad de una técnica viene reflejada por la capacidad de obtener los mismos resultados en el análisis de los sueros, cuando se repite dicha técnica con los mismos criterios y bajo las mismas condiciones. Sin embargo, está descrita la gran dificultad en la reproducción de los resultados no sólo entre distintos laboratorios, sino también dentro del mismo laboratorio (168). La utilización de un control positivo es básico en la estandarización de las técnicas en el propio laboratorio. Para la utilización de la mismas técnicas en otros laboratorios se impone la necesidad de otro control positivo bien documentado para su utilización como control interno común a los demás laboratorios. Dado que en la actualidad las discrepancias entre laboratorios son grandes, es fundamental que cada laboratorio establezca sus propios criterios y los aplique a sus pacientes, sin comparar sus resultados con los obtenidos en otros laboratorios. Utilizando

los datos de distintos laboratorios, el clínico puede obtener un resultado confuso, lo que iría en perjuicio del propio paciente.

## V. CONCLUSIONES

1.- La rentabilidad del cultivo de Bb en un hospital de zona no endémica es muy baja, ya que no hemos conseguido aislar la cepa española de Bb a partir de muestras clínicas de pacientes.

2.- La infección por Bb no es excepcional en España. Hemos detectado 64 casos de pacientes que cumplían los criterios diagnósticos de BL y cuarenta y ocho que aún sin criterios, no se encontró otra etiología que justificara sus síntomas.

3.- Existe un alto porcentaje de pacientes positivos falsos (18%), siendo por tanto fundamental la exclusión previa de otras etiologías para el diagnóstico de BL.

4.- El antecedente de picadura de garrapata es el dato epidemiológico más interesante para la sospecha de BL.

5.- Las manifestaciones más frecuentes de BL en España son las neurológicas (62.5%), seguidas de las cutáneas (31%), las articulares (28%), y las cardiológicas (3%).

6.- La sensibilidad de IFI (75%) es mayor que la de ELISA (62%), y ésta muy similar a la del inmunoblot (61%) con la cepa B31.

7.- El inmunoblot (con la cepa B31) es la técnica más específica (85%) en el grupo de pacientes positivos falsos, principalmente en los enfermos con tuberculosis (91.5%). Le sigue el ELISA con una especificidad del 60%. La técnica menos específica en este grupo de pacientes es el IFI (27%).

8.- Existe una baja especificidad en el grupo de pacientes sin criterios de BL (30% por IFI, 39% por ELISA y 50% por inmunoblot con la cepa B31).

9.- En el grupo de donantes de sangre la especificidad es buena por las tres técnicas, siendo algo inferior por el inmunoblot (100% por IFI, 97.5% por ELISA y 80% por inmunoblot con la cepa B31).

10.- La concordancia entre IFI y ELISA es mejor en el grupo de pacientes con criterios de BL ( $K=0.46$ ) que en el que no cumplían dichos criterios ( $K=0.2$ ). La concordancia en el grupo de pacientes positivos falsos es muy baja ( $k=0.04$ ).

11.- Como método de despistaje son necesarias tanto IFI y ELISA. El inmunoblot con la cepa B31 es la mejor técnica para descartar las reacciones cruzadas con otras etiologías.

12.- El inmunoblot con la cepa Esp-1 no aporta mejores resultados que con la cepa B31.

13.- En la interpretación del inmunoblot, la fórmula de regresión logística  $\ln(p/q) = -2.07829 + (-10.18426 \times G72) + (7.29118 \times G63) + (18.72080 \times G60) + (4.14442 \times M41) + (8.02014 \times G38) + (11.74381 \times G34) + (12.43657 \times M21) + (-8.59503 \times G21)$  constituye un buen modelo matemático predictivo de BL.

## VI. BIBLIOGRAFIA



- 1.- Burgdorfer W. The enlarging spectrum of tick-borne spirochetes. Rev Infect Dis 1986; 8:932-940.
- 2.- Barbour A.G., Hayes S.F. Biology of Borrelia species. Microbiol Rev 1986; 50:381-400.
- 3.- Uruñuela J., Díaz D. Eritema Crónico Migrans. Act Dermosifilog 1977; 68:109-110.
- 4.- Pascual E. Enfermedad de Lyme: una nueva enfermedad infecciosa. Med Clin (Barc) 1983; 81: 856-858.
- 5.- Guerrero A., Serrano M-J., García-Moncó C. Grupo de estudio para la enfermedad de Lyme en España. Borreliosis de Lyme en España. Med Clin 1988; 90:434.
- 6.- Uría D.F., Calatayud M., Monguelos J.M. Meguel M.D., Cobos A., Suárez T. Meningopolineuritis como manifestación de la enfermedad de Lyme. Med Clin (Barc) 1987; 89:381-3.
- 7.- García-Moncó J.C., Benach J.L., Coleman J.L., Galbe J.L., Szczepanski A., Fernández Villar B., Norton Hughes C.A., Johnson R.C. Caracterización de una cepa española de Borrelia burgdorferi. Med Clin (Barc) 1992; 98:89-93.
- 8.- Afzelius A. Verhandlungen der dermatologischen gesellschaft zu Stockholm, 28 October 1909. Arch Dermatol Syph 1910; 101:404-406.
- 9.- Afzelius A. Erythema chronicum migrans. Acta Derm Venereol (Stockh) 1921; 2:120-125.
- 10.- Herxheimer K., Hartmann K. Uber Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch Dermatol Syph 1902; 61:57-76, 255-300.
- 11.- Burckhardt J.L. Zur Frage der Follikel- und Keimzentrenbildung in der Haut. Frankf z Pathol 1911; 6:352-359.

12.- Lipschütz B., Weiterer Beitrag zur Kenntnis der "Erythema chronicum migrans". Arch Dermatol Syph 1923; 143:365-374.

13.- Lennhoff C. Spirochaetas in aetiologically obscure diseases. Acta Derm Venereol (Stockh) 1948; 28: 295-324.

14.- Scrimenti R.J. Erythema chronicum migrans. Arch Dermatol (Stockh) 1970; 102:104-105.

15.- Hellerström S. Erythema chronicum migrans Afzelius with meningitis. South Med J 1950; 43:330-334.

16.- Dahlsgaard-Nielsen T., Kierkegaard A. Allergic meningitis and chronic erythema migrans Afzelii after bite by Ixodes reduvius. Act Allergol (KBH) 1948; 1:388-393.

17.- Hollström E. Penicillin treatment of erythema migrans Afzelius. Acta Derm Venereol (Stockh) 1951; 31:235-243.

18.- Binder E., Doepfmer R., Hornstein O. Experimentelle Übertragung des Erythema chronicum migrans von Mensch zu Mensch. Hautarzt 1955; 6:494-496.

19.- Götz H. Die Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer als Infektions Krankheit. Hautarzt 1954/1955; 5:491-504, 6:249-252.

20.- Dègos R., Tourraine R., Arquete J. L'erythema chronicum migrans. Syph 1962; 89:247-260.

21.- Giroud P., Capponi M., Dumas N. Rickettsioses et lésions cutanées en dehors de syndromes fébriles. Bull Soc Pathol Exot 1962; 55:958-962.

22.- Giroud P., Giroud M.L. Agglutination des rickettsies, test de séroprotection et réaction d'hyper-sensitivité. Bull Soc

Path Est 1944; 37:84-93.

23.- Weber K. Erkrankungen nel Zeckenbiss und ihre Behandlung. Therapie Gegenw 1973; 112:1402-1409.

24.- Sandbank M., Feuermann E.J. Ultrastructural observation of rickettsia-like bodies in erythema chronicum migrans. J Cutan Pathol 1979; 6:253-264.

25.- Weber K. Serological study with rickettsial antigen on erythema chronicum migrans. Dermatologica 1981; 163:460-467.

26.- Flanagan B.P. Erythema chronicum migrans Afzelius in Americans. Arch Dermatol 1962; 86:410-411.

27.- Mast W.E., Burrows W.M. Erythema chronicum migrans in the Unites States. JAMA 1976; 236:859-860.

28.- Steere A.C., Malawista S.E., Snyderman D.R., Shope R.E., Andiman W.A., Ross M.R., Steele R.M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthritis Rheum 1977; 20:7-17.

29.- Steere A.C., Malawista S.E., Hardin J.A., Ruddy S., Askenase P.W., Andiman W.A. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. Ann Intern Med 1977; 86:685-698.

30.- Steere A.C., Broderick T.F., Malawista S.E. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. Am J Epidemiol 1978; 108:312-321.

31.- Wallis R.C., Brown S.E., Kloter K.O., Main A.J., Jr. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: field study of ticks. Am J Epidemiol 1978; 108:322-327.

32.- Steere A.C., Malawista S.E. Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of Ixodes dammini. Ann Intern Med 1979; 91:730-733.

33.- Spielman A., Clifford C.M., Piesman J. Human babesiosis on Nantucket Island, USA: Description of the vector, Ixodes dammini, N.Sp. (Acarina: Ixodidae). J Med Entomol 1979; 15:218-234.

34.- Burgdorfer W. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to ticks vectors. Yale J Biol Med 1984; 57:515-520.

35.- Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grunwaldt E., Davis J.P. Lyme Disease, a tick-borne spirochetosis? Science 1982; 216:1317-1319.

36.- Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Peter O., Aeschlimann A. Erythema chronicum migrans, a tickborne spirochetosis. Acta Trop (Brasil) 1983; 40:79-83.

37.- Barbour A.G., Burgdorfer W., Grunwald E., Steere A.C. Antibodies of patients with Lyme disease to components of the Ixodes dammini spirochete. J Clin Invest 1983; 73:504-515.

38.- Benach J.L., Bosler E.M., Hanrahan J.P., Coleman J.L., Habicht G.S., Bast T.F., Cameron D.J., Ziegler J.L., Edelman R., Burgdorfer W., Barbour A.G., Kaslow R.A. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. N Eng J Med 1983; 308:740-742.

39.- Waldo E.D., Sidhu G.S. The spirochete in erythema chronicum migrans. Demonstration by light and electron microscopy. Am J Dermatopathol 1983; 5:125-127.

40.- Steere A.C., Grodzicki R.L., Craft J.E., Shrestha M., Kornblatt A.N., Malawista S.E. Recovery of Lyme disease spirochetes from patients. Yale J Biol Med 1984; 57:557-560.

- 41.- Barbour A.G., Burgdorfer W., Hayes S.F., Peter O., Aeschlimann A. Isolation of a cultivable spirochete from Ixodes ricinus ticks in Switzerland. Curr Microbiol 1983; 8:123-126.
- 42.- Garin C., Bujadoux C. Paralysie par les tiques. J Med Lyon 1922; 71:765-767.
- 43.- Hellerström S. Erythema chronicum migrans Afzelii. Acta Derm Venereol (Stockh) 1930; 11:315-321.
- 44.- Weber K. Erythema-chronicum-migrans-Meningitis - eine bakterielle infektionskrankheit? Munch Med Wochenschr 1974; 116:1993-1998.
- 45.- Steere A.C., Batsford W.P., Weinberg M., Alexander J., Berger H.J., Wolfson S., Malawista S.E. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. Ann Intern Med 1980; 93:8-16.
- 46.- Weber K., Schierz G., Wilske B., Preac-Mursic V., Burgdorfer W., Barbour A.G. Antibodies against Ixodes dammini and Ixodes ricinus spirochetes in tick-borne disorders. 11th ADF meeting, Kiel, 12 Nov 1983 (abstract). Arch Dermatol Res 1983-1984; 276:260.
- 47.- Guerrero A. Infección por Borrelia burgdorferi. Enf Inf Microbiol Clin 1988; 6:56-66.
- 48.- Johnson R.C., Schmid G.P., Hyde F.W., Steigerwalt A.G., Brenner D.J. Borrelia burgdorferi sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. Int J Syst Bacteriol 1984; 34:496-497.
- 49.- Lyme disease. Morbid Mortal Weekly Rep 1982; 31:367-368.
- 50.- Schmid G.P. The global distribution of Lyme disease. Rev Infect Dis 1985; 7:41-50.

51.- Schmid G.P. Epidemiology and clinical similarities of human spirochetal diseases. Rev Infect Dis 1989; 11(S6):1460-1469.

52.- Krieg N.R., Holt J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.1. 1984. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, London.

53.- Coleman J.L., Benach J.L., Beck G., Habicht G.S. Isolation of outer envelope from Borrelia burgdorferi. Zentralbl Bakteriол Hyg 1986; 263:123-126.

54.- Barbour A.G. The molecular biology of Borrelia. Rev Infect Dis 1989; 11(S6):1470-1474.

55.- Wilske B., Preac-Mursic V., Schierz G., Kühbeck R., Barbour A.G., Kramer M. Antigenic variability of Borrelia burgdorferi. Ann NY Acad Sci 1988; 539:126-143.

56.- Barbour A.G., Heiland R.A., Howe T.R. Heterogeneity of major proteins of Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. J Infect Dis 1985; 152:478-484.

57.- Ferdows M.S., Barbour A.G. Megabase-sized linear DNA in the bacterium Borrelia burgdorferi, the Lyme disease agent. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:5969-5973.

58.- Hyde F.W., Johnson R.C. Genetic relationship of Lyme disease spirochetes to Borrelia, Treponema, and Leptospira spp. J Clin Microbiol 1984; 20:151-154.

59.- Schwan T.G., Burgdorfer W., Garon C.F. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi, as a result of in vitro cultivation. Infect Immun 1988; 56:1831-1836.

60.- Hansen K., Bangsberg J.M., Fjordvang H., Pedersen N.S., Hinderesson P. Immunochemical characterization and isolation of the gene for a Borrelia burgdorferi immunodominant 60-kilodanton antigen common to a wide range of bacteria. Infect Immun 1988; 56:2047-2053.

61.- Hansen K., Hinderesson P., Pedersen N.S. Measurement of antibodies to the Borrelia burgdorferi flagellum improves serodiagnosis in Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 1988; 26:338-346.

62.- Barbour A.G. Plasmid analysis of Borrelia burgdorferi, the Lyme disease agent. J Clin Microbiol 1988; 26:475-478.

63.- Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffarretti J.C., Assous M., Grimont P.A.D. Delineation of Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii sp. nov., and group VS461 associated with Lyme Borreliosis. Int J Syst Bacteriol 1992; 115:91.

64.- Wilske B., Preac-Pursic V., Goebel U.B., Graf B., Jauris S., Soutsched E., Schwab E., Zumstein G. An OspA serotyping system for Borrelia burgdorferi based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J Clin Microbiol 1993; 31:340-350.

65.- Kelly R.T. Cultivation of Borrelia hermsii. Science 1971; 173:443.

66.- Stoenner H.G., Dodd T., Larsen C. Antigenic variation of Borrelia hermsii. J Exp Med 1982; 156:1297-1311.

67.- Barbour A.G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med 1984; 57:521-525.

68.- De Koning J.R., Bosma R.B., Hoogkamp-Korstanje J.A.A. Demonstration of spirochaetes in patients with Lyme disease with

modified silver stain. J Med Microbiol 1987; 23:261-267.

69.- Duray P.H., Johnson R.C. The hispathology of experimentally-infected hamsters with the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi. Proc Soc Exp Biol Med 1986; 181:263-269.

70.- Bozsik B.P. Borrelia burgdorferi stained with acidic acridine orange. Ann Immunol Hung 1985; 25:335-344.

71.- Hoskins J.D., Cupp E.W. Ticks of veterinary importance. Part I. The ixodidae family: identification, behavior, and associated diseases. Compend Cont Educ Pract Vet 1988; 10:564-580.

72.- Lecture notes on medical entomology. Blackwell Scientific Publications. Capítulo 17.

73.- Anderson J.F., Johnson R.C., Magnarelli L.A. Seasonal prevalence of Borrelia burgdorferi in natural population of white-footed mice, Peromyscus leucopus. J Clin Microbiol 1987; 25:1564-1566.

74.- Anderson J.F., Johnson R.C., Magnarelli L.S., Hyde F.W. Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent Borrelia burgdorferi. Infect Immun 1986; 51:394-396.

75.- Anderson J.F., Magnarelli L.A., Burgdorfer W., Barbour A.G. Spirochetes in Ixodes dammini and mammals from Connecticut. Am J Trop Med Hyg 1983; 32:818-824.

76.- Lane R.S., Burgdorfer W. Transovarial and transstadial passage of Borrelia burgdorferi in the Western black-legged tick, Ixodes pacificus (Acari: Ixodidae). Am J Trop Med Hyg 1987; 37:188-192.



77.- Burgdorfer W., Hayes S.F., Benach J.L. Development of Borrelia burgdorferi in ixodid tick vectors. Ann NY Acad Sci 1988; 539:172-179.

78.- Ribeiro J.M.C., Mather T.N., Piesman J., Spielman A. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari:Ixodidae). J Med Entomol 1987; 24:201-205.

79.- Cordero del Campillo et al. Índice catálogo de zooparásitos ibéricos. 1980; Madrid, Servicio de publicaciones de la Seguridad Social.

80.- Oteo J.A., Estrada A. Ixodes ricinus, vector comprobado de Borrelia burgdorferi en España. Med Clin 1990; 96:599.

81.- Matuschka F-R., Fischer P., Heiler M., Richter D., Spielman A. Capacity of european animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. J Infect Dis 1992; 165:479-483.

82.- Magnarelli S.A., Anderson J.F., Barbour A.G. The etiologic agent of Lyme disease in deer flies, horse flies and mosquitoes. J Infect Dis 1986; 154:355-358.

83.- Anderson J.F., Magnarelli L.A. Avian and mammalian host for spirochete infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. Yale J Biol Med 1984; 57:627-642.

84.- Anderson J.F., Johnson R.C., Magnarelli L.A., Hyde F.W. Identification of endemic foci of Lyme disease: Isolation of Borrelia burgdorferi from feral rodents and the tick Dermacentor variabilis. J Clin Microbiol 1985; 22:36-38.

85.- Burgess E.C., Gendron-Fitzpatrick A., Wright W.O. Arthritis and systemic disease caused by Borrelia burgdorferi infection in a cow. J Am Vet Med Assoc 1987; 191:1468-1470.



86.- Schlesinger P.A., Duray P.H., Burke B.A., Steere A.C., Stillman M.T. Maternal-fetal transmission of the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi. Ann Intern Med 1985; 103:67-68.

87.- Johnson Y.E., Steere A.C., Kashgarian M., Boza J., Malawista S.E., Askenase P.W. Lyme arthritis: spirochetes found in synovial microangiopathic lesions. Am J Pathol 1985; 118:26-34.

88.- Kantoff P.W., Shupack J.L., Greene J.B. Histologic demonstration of intradermal spirochetes in a patient with Lyme disease. Am J Med Sci 1984; 287:40-42.

89.- Kirsch M., Ruben F.L., Steere A.C., Duray P.H., Norden C.W., Winkelstien A. Fatal adult respiratory distress in a patient with Lyme disease. J Am Med Assoc 1988; 259:2737-2739.

90.- Park H.K., Jones B.E., Barbour A.G. Erythema chronicum migrans: diagnosis by monoclonal antibodies. J Am Acad Dermatol 1986; 15:406-410.

91.- Burgdorfer W., Lane R.S., Barbour A.G., Gresbrink R.A., Anderson J.R. The western black-legged tick, Ixodes pacificus: a vector of Borrelia burgdorferi. Am J Trop Med Hyg 1985; 34:925-930.

92.- Aberer E., Manitz M., Neumann R., Stanek G. Immunoperoxidase staining of spirochetes in borrelia skin disease. Ann NY Acad Sci 1988; 539:362-364.

93.- Simpson W.J., Garon C.F., Schwan T.G. Borrelia burgdorferi contains DNA sequences that are species specific and plasmid associated. Infect Immun 1990; 58:847-853.

94.- Schwan T.G., Simpson W.J., Schrumpf M.E., Karstens R.H. Identification of Borrelia burgdorferi and B.hermsii using DNA hybridization probes. J Clin Microbiol 1989; 27:1734-1738.

95.- Hyde F.W., Johnson R.C., White T.J., et al. Detection of antigens in urine of mice and humans infected with Borrelia burgdorferi, etiologic agent of Lyme disease. J Clin Microbiol 1989; 27:58-61.

96.- Valesova M., Trnavasky K., Hulinska D., Alusik S., Janiusek J., Jirous J. Detection of Borrelia in the synovial tissue from patient with Lyme borreliosis by electron microscopy. J Rheumatol 1989; 16:1502-1505.

97.- Lebech A-M., Hansen K. Detection of Borrelia burgdorferi DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol 1992; 30:1646-1653.

98.- Rabb D.C., Leshner J.L.Jr., Chandler F.W. Polymerase Chain Reaction confirmation of Borrelia burgdorferi in benign lymphocytic infiltrate of dermis. J Am Dermatol 1992; 26:267-8.

99.- Steere A.C., Grodzicki R.L., Kornblatt A.N., Craft J.E., Barbour A.G., Burgdorfer W., Schmid G.P., Johnson E., Malawista S.E. The spirochetal etiology of Lyme disease. N Eng J Med 1983; 308:733-740.

100.- Nadelman R.B., Pavia C.S. Isolation of Borrelia burgdorferi from the blood of seven patients with Lyme disease. Am J Med 1990; 88:21-26.

101.- Karlsson M., Hovind-Hougen K., Svenungsson B., Stiernstedt G. Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 1990; 28:473-479.

102.- Schimidli J., Hunziker T., Moesli P., Schaad U.B. Cultivation of Borrelia burgdorferi from joint fluid three months after treatment of facial palsy due to Lyme borreliosis. J Infect Dis 1988; 158:905-906.

103.- Asbrink E., Hovmark A., Olsson I. Lymphadenosis benigna cutis solitaria-Borrelia lymphocytoma in Sweden. Zentralbl Bacteriol (Suppl) 1989; 18:156-163.

104.- Weber K., Preac-Mursic V., Reimers C.D. Spirochetes isolated from two patients with morphea. Infection 1988; 16:25-26.

105.- Stanek G., Klein J., Bittner R., Glogar D. Isolation of Borrelia burgdorferi from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. N Engl J Med 1990; 110:339-345.

106.- García-Moncó J.C., Benach J.L. The pathogenesis of Lyme disease. Rheum Clin North Am 1989; 15:711-726.

107.- García-Moncó J.C., Fernández Villar B., Benach J.L. Adherence of the Lyme disease spirochete to glial cells and cells of glial origin. J Infect Dis 1989; 160:497-506.

108.- Preac-Mursic V., Patsouris E., Wilske B., Reinhardt S., Grob B., Mehra P. Persistence of Borrelia burgdorferi and histopathological alterations in experimentally infected animals: comparison with histopathological findings in human Lyme disease. Infection 1990; 18:332-341.

109.- Wilske B., Anderson J.F., Baranton G., Barbour A.G., Hoving-Hougen K., Johnson R.C., Preac-Mursic V. Workshop summary: taxonomy of Borrelia spp. Scand J Infect Dis Suppl 1991; 77:108-129.

110.- Steere A.C., Hardin J.A., Ruddy S. et al. Lyme arthritis: Correlation of serum and cryoglobulin IgM with activity, and serum IgG with remission. Arth Rheum 1986; 22:472-483.

111.- Russell H., Sampson J.S., Schmid G.P., Wilkinson H.W., Plikaytis B. Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect

immunofluorescence assay for Lyme disease. J Infect Dis 1984; 149:465-470.

112.- Craft J.E., Fischer D.K., Shumamoto G.T., Steere A.C. Antigens of Borrelia burgdorferi recognized during Lyme disease. J Clin Invest 1986; 78:934-939.

113.- Ackermann R., Kabatzki J., Boisten P., Steere A.C., Grodzicki R.L., Hartung S., Runne V. Ixodes ricinus spirochete and European erythema chronicum migrans disease. Yale J Biol Med 1984; 57:573-580.

114.- Hunter E.F., Russel H., Farshy C.E., Sampson J.S., Larsen S.A. Evaluation of sera from patients with Lyme disease in the fluorescent treponemal antibody-absorption test for syphilis. Sexually Transmitted Diseases 1986; 13:232-236.

115.- Mertz L.E., Wobig G.H., Duffy J., Katzman J.A. Lyme disease ELISA: effects of sorbent on sensitivity and specificity. Mayo Clin Proc 1985; 60:402-406.

116.- Magnarelli L.A., Anderson J.F., Johnson R.C. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J Infect Dis 1987; 156:183-188.

117.- Wilske B., Schierz G., Preac-Mursic V., Weber K., Pfister H.W., Einhaupl K. Serological diagnosis of erythema migrans disease and related disorders. Infection 1984; 5:331-337.

118.- Grodzicki R.L., Steere A.C. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. J Infect Dis 1988; 157:790-797.

119.- Coleman J.L., Benach J.L. Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete: their role in early diagnosis. J Infect Dis 1987; 155:756-765.

120.- Magnarelli L.A., Anderson J.F., Barbour A.G. Enzyme-linked immunosorbent assays for Lyme disease: reactivity of subunits of Borrelia burgdorferi. J Infect Dis 1989; 159:43-50.

121.- Fawcett P.T., O'Brien A.E., Doughty R.A. An adsorption procedure to increase the specificity of enzyme-linked immunosorbent assays for Lyme disease without decreasing sensitivity. Arthritis Rheum 1989; 32:1041-1044.

122.- Berardi V.P., Weeks K.E., Steere A.C. Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody response by using an antibody-capture enzyme immunoassay. J Infect Dis 1988; 158:754-760.

123.- Schutzer S.E., Coyle P.K., Belman A.L., Golightly M.G., Drulle J. Sequestration of antibody to Borrelia burgdorferi in immuno complexes in seronegative Lyme disease. Lancet 1990; 336:312-315.

124.- Jiang W., Luft B.J., Schubach W., Dattwyler R.J., Gorevic P.D. Mapping the major antigenic domains of the native flagellar antigen of Borrelia burgdorferi. J Clin Microbiol 1992; 30:1535-1540.

125.- Luft B.J., Bosler E.M., Dattwyler R.J. Diagnosis of Lyme borreliosis. In Lyme disease: Molecular and immunologic approaches. 1993

126.- Stiernstedt G., Granström M., Hederstedt B., Skoldenberg B. Diagnosis of spirochetal meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in serum and cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1985; 21:819-825.

127.- Wilske B., Schierz G., Preac-Mursic V., von Busch K., Kühbeck R., Pfister H.W., Einhäupl K. Intrathecal production of specific antibodies against Borrelia burgdorferi in patients with

lymphocytic meningoradiculitis (Bannwarth's syndrome). J Infect Dis 1986; 153:304-314.

128.- Barbour A.G. Immunochemical analysis of Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med 1984; 57:581-586.

129.- Barbour A.G., Tessier S.L., Hayes S.F. Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. Infect Immun 1984; 45:94-100.

130.- Wilske B., Preac-Mursic V., Schierz G. Antigenic heterogeneity of European Borrelia burgdorferi strains isolated from patients and ticks. Lancet 1985; 1:1099.

131.- Anderson J.F., Magnarelli L.A., LeFebvre R.B., Andreatis T.G., McAninch J.B., Perng G-C., Johnson R.C. Antigenically variable Borrelia burgdorferi isolated from cottontail rabbits and Ixodes dentatus in rural and urban areas. J Clin Microbiol 1989; 27:13-20.

132.- Staneck G., Wewalka G., Groh V., Neumann R., Kristoferitsch W. Differences between Lyme disease and European arthropod-borne borrelia infections. Lancet 1985; i:401.

133.- Wilske B., Preac-Mursic V., Schierz G., Busch K.V. Immunochemical and immunological analysis of European Borrelia burgdorferi strains. Zentralbl Bakteriol Hyg (A) 1986; 263:92-102.

134.- Wilske B., Barbour A.G., Bergström S., Burmam N., Restrepo B.I., Rosa P.A., Schwan T., Soutschek E., Wallich R. Antigenic variation and strain heterogeneity in Borrelia spp. Res Microbiol 1992; 143:583-96.

135.- Magnarelli L.A., Anderson J.F. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of class-specific immunoglobulins to Borrelia burgdorferi. Am J Epidemiol 1988;

127:818-825.

136.- Simonson L.G., Goodman C.H., Bial J.J., et al. Quantitative relationship of Treponema denticola to severity of periodontal disease. Infect Immun 1988; 56:726-728.

137.- Lastavica C.C., Snyderman D.R., Schenkein D.P., et al. Demonstration of Borrelia burgdorferi in a patient with chronic Lyme arthritis. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (A) 1986; 263-288.

138.- Magnarelli L.A. Serological diagnosis of Lyme disease. Ann NY Acad Sci 1988; 539:154-161.

139.- Shrestha M., Grodzacki R.L., Steere A.C. Diagnosing early Lyme disease. Am J Med 1985; 78:235-240.

140.- Satz N., Ackermann R., Gern L., Aeschlimann A., Ott A., Knoblauch M. Zur Epidemiologie der Infektion mit Borrelia burgdorferi. Schweiz Med Wochenschr 1988; 118:422-426.

141.- Craft J.E., Grodzicki R.L., Steere A.C. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. J Infect Dis 1984; 149:789-795.

142.- Fister R.D., Weymouth L.A., McLaughlin J.C., Ryan R.W., Tilton R.C. Comparative evaluation of the three products for the detection of Borrelia burgdorferi antibody in human serum. J Clin Microbiol 1989; 27:2834-2837.

143.- Reinhold J.G. Total protein albumin, albumin and globulin. Standards Methods of Clinical Chemistry. Ed. D. Seligron. New York Academic Press 1983; 1:88.

144.- Laemmli U.K., Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. J Mol Biol 1973; 80:575-599.



- 145.- Rahn D.W., Malawista S.E. Lyme disease: Recommendations for diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 1991; 114:472-481.
- 146.- Fleiss J.L. Statistical methods for rates and proportions. 2nd ed. New York, NY: John Wiley & Sons Inc; 1981.
- 147.- Landis J.R., Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-174.
- 148.- Hosmer D.W., Lemeshow S. Applied Logistic Regression. John Wiley & Sons. New York; 1989.
- 149.- Rawlings J.A., Fournier P.V., Teltow G.J. Isolation of *Borrelia spirochetes* from patients in Texas. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1148-1150.
- 150.- Anda P., Rodríguez I., de la Loma A., Fernández M.V., Lozano A. A serological survey and review of clinical Lyme borreliosis in Spain. *Clin Infect Dis* 1992; 16:310-9.
- 151.- Oteo J.A., Martínez de Artola V., Casas J.M., Estrada Peña A. Enfermedad de Lyme en la Rioja. *Med Clin (Barc)* 1991; 96:599.
- 152.- Gómez-Mateos J.M., Sánchez Porto A., Lozano de León R., López-Cortés L. Enfermedad de Lyme en la provincia de Sevilla. *Med Clin (Barc)* 1990; 94:236-7.
- 153.- Tamayo L., García-Moncó J.C., Bratos M.A., Orduña A., Ortiz de Lejarazu R., Rodríguez Torres A. Anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi* en un grupo de población de Valladolid. *Enf Inf Microbiol Clin* 1990; 8:663-4.
- 154.- Steere A.C., Bartenhagen N.H., Craft J.E. et al. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1983; 99:76-82.

155.- Stanek G., Pletschette M., Flamm H. European Lyme borreliosis. Ann N Y Acad Sci 1988; 539:274-82.

156.- Soria C., Freire P., Serrano M.J., Guerrero A. Manifestaciones dermatológicas de la infección por Borrelia burgdorferi. Enf Inf Microbiol clin 1990; 8:54-60.

157.- Cutler S.J., Wright D.J.M. Comparison of immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosing Lyme disease. J Clin Pathol 1989; 42:869-871.

158.- Magnarelli L.A., Meegan J.M., Anderson J.F., Chappell W.A. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. J Clin Microbiol 1984; 20:181-184.

159.- Shempp C., Bocklage H., Lange R., Kolmel H.W., Orfanos C.E., Gollnick H. Further evidence for Borrelia burgdorferi infection in morphea and lichen sclerosus et atrophicus confirmed by DNA amplification. J Invest Dermatol 1993; 100:717-20.

160.- Fumarola D. Multiple sclerosis and Borrelia burgdorferi. Lancet 1986; 2:575.

161.- Raoult D., Hechemy K.E., Baranton G. Cross-reaction with antigen of sera from patients with immunodeficiency virus infection, syphilis and leptospirosis. J Clin Microbiol 1989; 27:2152-2155.

162.- Karlsson M., Möllegård I., Stiernstedt G., Wretling B. Comparison of Western Blot and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Lyme borreliosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 871-877.

163.- Rose C.D., Fawcett P.I., Singsen B.H., Dubbs B., Doughty R.A. Use of western blot and enzyme-linked immunosorbent assays to assist in the diagnosis of Lyme disease. Pediatrics

1991; 88:465-470.

164.- Bingnan M.A., Christen B., Leung D., Vigo-Pelfrey C. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by Western Immunoblot: reactivity of various significant antibodies against Borrelia burgdorferi. J Clin Microbiol 1992; 30:370-376.

165.- Pachner A.R., Ricalton N. Western blotting in evaluating Lyme seropositivity and the utility of a gel densitometric approach. Neurology 1992; 42:2185-2192.

166.- Magnarelli L.A., Miller J.M., Anderson J.F., Riviere G.F. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. J Clin Microbiol 1990; 28:1276-1279.

167.- Weiland T., Kuhn P., Laufs R., Heesemann J. Prevalence of Borrelia burgdorferi antibodies in Hamburg blood donors. Beitr Infusionther 1992; 30:92-5.

168.- Bakken L.L., Case K.L., Callister S.M., Bourdeau N.J., Schell R.F. Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme disease serology. JAMA 1992; 268:891-895.